ORSAY
n° d'ordre :
1670

# THESE

présentée à l'Université de Paris-Sud, pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES.

par Jack FARINEAU

Service de Biophysique, Département de Biologie, CEN Saclay

## CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ASSIMILATION PHOTOSYNTHETIQUE DU $CO_2$ CHEZ UNE PLANTE C4, LE MAIS.

Etude, au moyen de radioisotopes, du métabolisme des acides C4 et des intermédiaires du cycle de Calvin chez la feuille en photosynthèse normale ou perturbée. Photoassimilation du $CO_2$ par les cellules de gaines périvasculaires isolées

Soutenue le 23 juin 1976

devant le Jury composé de MM.

| | |
|---|---|
| R. ULRICH | Président |
| A. MOYSE | Rapporteur |
| R. BOURDU | |
| E. JOLIVET | |
| E. ROUX | |

ORSAY
n° d'ordre :
1670

# T H E S E

présentée à l'Université de Paris-Sud, pour obtenir le grade de

DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES.

par Jack FARINEAU

Service de Biophysique, Département de Biologie, CEN Saclay

## CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ASSIMILATION PHOTOSYNTHETIQUE DU $CO_2$ CHEZ UNE PLANTE C4, LE MAIS.

Etude, au moyen de radioisotopes, du métabolisme des acides C4 et des intermédiaires du cycle de Calvin chez la feuille en photosynthèse normale ou perturbée. Photoassimilation du $CO_2$ par les cellules de gaines périvasculaires isolées

Soutenue le 23 juin 1976

devant le Jury composé de MM.

| | |
|---|---|
| R. ULRICH | Président |
| A. MOYSE | Rapporteur |
| R. BOURDU | |
| E. JOLIVET | |
| E. ROUX | |

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# T A B L E  D E S  M A T I E R E S

I N T R O D U C T I O N - H I S T O R I Q U E

GENERALITES ..... 1

CARACTERISTIQUES DES PLANTES C4 ..... 3

PROBLEMES POSES PAR LE DEROULEMENT DE LA PHOTOSYNTHESE C4. DETERMINATION DES LOCALISATIONS CELLULAIRES DES ACTIVITES METABOLIQUES. INTERPRETATIONS ..... 12

I. Faits expérimentaux établissant l'existence d'une compartimentation des activités métaboliques. Critique des résultats ..... 13

1. Localisation cellulaire des activités enzymatiques ..... 13

a) Méthodes d'études ..... 13
b) Résultats ..... 15

2. Etude du métabolisme carboné photosynthétique et des activités photochimiques, effectuée sur des systèmes isolés : plastes ou cellules ..... 21

A. Activités photochimiques et de photophosphorylation des plastes de mésophylle et de gaine ..... 21

a) Cas du maïs et des plantes C4 du groupe 1 ..... 21
b) Plantes C4 des groupes 2 et 3 ..... 25

B. Photoassimilation du $CO_2$ par les cellules (ou protoplastes) et plastes isolés ..... 26

a) Mésophylle ..... 26
b) Cellules de gaine ..... 29

II. Oxygène et photosynthèse chez les plantes C3 et C4. Déroulement de la photorespiration ..... 34

A. Chez les plantes C3 ..... 34

B. Cas des plantes C4 ..... 36

III. Déroulement de la photosynthèse chez les plantes C4 : interprétations contradictoires. Examen critique des hypothèses . 37

1. Interprétation n° 1 ..... 39

a) Cas du maïs et des plantes du groupe 1 ..... 39
b) Autres plantes C4 ..... 41

2. Interprétation n° 2 (maïs) ..... 44
3. Interprétation n° 3 ..... 46

Critique des interprétations ..... 46

PROBLEMES DONT L'ETUDE A ETE ABORDEE DANS LE MEMOIRE ..... 50

M A T E R I E L S - M E T H O D E S E T T E C H N I Q U E S

MATERIELS ..... 54

METHODES ET TECHNIQUES ..... 55

I. Généralités. Méthodes d'étude du métabolisme photosynthétique par application de techniques isotopiques ..... 55

A. Rappels ..... 56

1. Le cycle de Calvin ..... 56
2. L'état stationnaire en photosynthèse ..... 58
3. Rupture d'état stationnaire ..... 59

B. La méthode des pools ..... 60

1. Principe ..... 60
2. Application de la méthode des pools à l'étude du cycle de Calvin et de la photosynthèse C4 ..... 62

C. Techniques de marquage des intermédiaires du CRPP ; cas particulier de la méthode d'équilibre isotopique ..... 64

1. Généralités ..... 64
2. Théorie ..... 64

3. Intérêt de la méthode d'équilibre isotopique ..... 68
4. Mise en oeuvre de la méthode d'équilibre isotopique chez des algues en photosynthèse ..... 69

II. Réalisation pratique d'expériences à l'équilibre isotopique avec des feuilles aériennes ..... 70

A. Matériel ..... 70
B. Expérimentation ..... 71
C. Fixation des échantillons, séparation et dosage des composés ..... 77
D. Principe du dosage des composés en application de la méthode d'équilibre isotopique ..... 77

1. Principe ..... 77
2. Précision de l'évaluation ..... 79
3. Critique de la méthode ..... 82

III. Utilisation des techniques de charge ..... 84

A. Exposition au $^{14}CO_2$ gazeux ..... 84
B. Infiltration de $^{14}C$-bicarbonate ..... 84

IV. Techniques utilisées pour la fixation des échantillons, la séparation et le dosage des composés ..... 86

A. Fixation et traitement des échantillons en vue des opérations de séparation ..... 86
B. Séparation des composés ..... 87

1. Séparation préparative sur papier ..... 87
2. Séparation analytique des composés marqués ..... 88

C. Dosage enzymatique des composés ..... 93

R E S U L T A T S  E X P E R I M E N T A U X

P R E M I E R E  P A R T I E - E T U D E S  M E\T A B O L I Q U E S
D E  L A  F E U I L L E  D E  M A I S ..... 95

CHAPITRE I - MISE EN EVIDENCE D'UN DEROULEMENT NORMAL DU CYCLE DE CALVIN CHEZ LES FEUILLES DE MAIS EN PHOTOSYNTHESE . 95

Protocole expérimental ..... 99

Résultats ..... 100

1. Mesure des réservoirs de quelques intermédiaires phosphorylés en photosynthèse chez le maïs et Phragmites ..... 100
2. Effet de la privation de $CO_2$ à la lumière sur la taille des réservoirs de quelques composés phosphorylés chez le maïs et Phragmites ..... 102
3. Action de la CMU chez les feuilles de maïs illuminées sous azote ..... 105
4. Effet de l'oxygène en atmosphère privée de $CO_2$, à la lumière 106

Discussion - Conclusions ..... 107

CHAPITRE II - ROLE DES ACIDES C4 DANS LE DEROULEMENT DE LA PHOTOSYNTHESE CHEZ LE MAIS ..... 115

A. LA DECARBOXYLATION DES ACIDES C4 REPRESENTE UNE SOURCE DE $CO_2$ UTILISEE POUR LE DEROULEMENT DU CYCLE DE CALVIN, CHEZ LES FEUILLES DE MAIS ..... 116

1. Etude du dégagement d'oxygène chez les feuilles illuminées sous azote ..... 116
2. Etude cinétique de l'évolution des pools de composés du cycle de Calvin et d'acides C4 chez les feuilles illuminées sous azote ..... 118

Discussion - Conclusions ..... 124

B. MODES D'UTILISATION DU $CO_2$ ATMOSPHERIQUE EN PHOTOSYNTHESE CHEZ LE MAIS ..... 128

Protocole expérimental ..... 131

Résultats ..... 132

1. Effets de prétraitements sur la fixation du $^{14}CO_2$ (alimentation par voie gazeuse) ..... 132

a) Incorporation de $^{14}CO_2$ à la lumière ..... 133
b) Incorporation de $^{14}CO_2$ à l'obscurité ..... 138

2. Alimentation des feuilles en bicarbonate-$^{14}C$ par infiltration 140

Conclusions - Discussion ..... 142

DEUXIEME PARTIE - ETUDE DE LA PHOTOASSIMILATION DU $CO_2$ PAR DES SYSTEMES ISOLES, PLASTES OU CELLULES, DE FEUILLES DE MAIS ..... 148

INTRODUCTION ..... 148

CHOIX D'UNE METHODE D'ISOLEMENT DES CELLULES DE GAINE ET DE MESOPHYLLE ..... 150

a) Méthodes de broyage ..... 150
b) Méthodes de digestion enzymatique ..... 152

RESULTATS ..... 153

I. Assimilation du $CO_2$ par les plastes isolés de cellules de mésophylle ..... 153

II. Photoassimilation du $CO_2$ par les cellules de gaines périvasculaires isolées de maïs ..... 153

- Stimulation de la fixation du $CO_2$ par l'addition d'intermédiaires variés du cycle de Calvin ; arguments en faveur d'une déficience de l'activité du photosystème II ..... 154

- Rôle du malate en tant que source de $CO_2$ et de pouvoir réducteur pour l'activité photosynthétique des cellules de gaines isolées ..... 165

Discussion - Conclusion ..... 171

CONCLUSION GENERALE ..... 181

BIBLIOGRAPHIE ..... 186

ANNEXE ET PLANCHES ..... 203

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548109_0016

# ABREVIATIONS

- PGA ou 3 PGA acide 3-phosphoglycérique ;
- RuDP ou Ru 1,5$P_2$ - ribulose-1,5-diphosphate ;
- FruDP, FDP ou Fru 1,6$P_2$ - fructose-1,6-diphosphate ;
- DHAP dihydroxyacétone phosphate ;
- R5P ribose-5-phosphate ;
- G6P glucose 6 phosphate ;
- Fru6P fructose 6 phosphate ;
- Sed7P sédoheptulose 7-phosphate
- PEP phosphoénolpyruvate ;
- UDPG uridine diphosphoglucose ;
- NADP nicotinamide dinucléotide phosphate ;
- NAD nicotinamide dinucléotide ;
- RuDPC ribulose diphosphate carboxylase ;
- PEPC phosphoénolpyruvate carboxylase ;
- αGDH α glycérophosphate déshydrogénase ;
- TIM trioses phosphate isomérase ;
- CMU 3-(3-chlorophényl)-1,1-diméthylurée ;
- DCMU 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthylurée ;
- RAS radioactivité spécifique ;
- CRPP cycle réductif des pentoses phosphate ;
- PS photosystème (PS II : photosystème II) ;
- C3 (plantes C3) - plantes incorporant principalement le $CO_2$ atmosphérique en photosynthèse dans des composés C3.
- C4 (plantes C4) - plantes possédant la voie de synthèse des acides C4-dicarboxyliques ; plantes incorporant principalement le $CO_2$ en photosynthèse dans des acides C4-dicarboxyliques ; plantes chez lesquelles le déroulement de la photosynthèse se caractérise par l'incorporation primaire du $CO_2$ atmosphérique dans des acides C4-dicarboxyliques, puis le transfert du $CO_2$ à partir des acides C4 dans des composés C3.
- CAM (plantes CAM) plantes possédant le métabolisme carboné des Crassulacées, de "crassulacean acid metabolism".
- Chl chlorophylle.

# I N T R O D U C T I O N - H I S T O R I Q U E

## GENERALITES

Les plantes supérieures fixent, à la lumière, le $CO_2$ atmosphérique pour faire la synthèse de leurs propres constituants carbonés : sucres, acides aminés, etc ... Une voie métabolique d'assimilation photosynthétique du $CO_2$ appelée cycle réductif des pentoses phosphate (CRPP) a été décrite par Calvin et coll. [Bassham et Calvin, 1957] chez des algues unicellulaires, et a pu également être mise en évidence chez des plantes supérieures aériennes (orge, tomate) [Aronoff et al., 1947, Galmiche, 1963]. Lorsque ces végétaux sont soumis à une alimentation de très courte durée (5-10 secondes) par le $^{14}CO_2$, le premier produit stable synthétisé par fixation du $^{14}CO_2$ est, chez la plupart des plantes supérieures et chez les algues, un composé à 3 carbones, l'acide phosphoglycérique ou PGA. L'incorporation de $^{14}C$ dans les acides organiques C4-dicarboxyliques (malate et aspartate) est faible (3-5% du $^{14}C$ total incorporé). Dans les années 1955-60, il ne paraissait plus faire de doute que le CRPP (ou cycle de Calvin) représentait la seule voie d'assimilation photosynthétique du $CO_2$ chez les plantes supérieures. De ce fait l'intérêt des chercheurs pour l'étude du métabolisme carboné photosynthétique a rapidement décru à partir de 1958-60. Cependant un groupe de chercheurs appartenant à la Hawaian Sugar Planter's Association Experimental Station (Kortschak, Burr, etc ..) avaient mis en évidence l'existence, chez une plante

tropicale, la canne à sucre, de particularités biochimiques tout à fait intéressantes puisque le cycle de Calvin ne semblait pas devoir se dérouler chez cette plante pendant la photosynthèse ; en effet, il avait été observé que les composés marqués par le $^{14}C$, au terme d'une alimentation de courte durée par le $^{14}CO_2$ sont des acides C4 (malate et aspartate), le $^{14}C$-PGA n'étant même pas détecté dans les feuilles à l'époque [revue de Burr et al., 1957]. Les publications du groupe n'avaient pas rencontré d'écho et il fallut attendre 1965 pour que leurs résultats apparaissent dans une revue à grande diffusion [Kortschak et al., 1965]. Tarchevsky et Karpilov [1963], avaient entre temps, trouvé des résultats semblables chez le maïs. Les recherches sur les premiers composés synthétisés en photosynthèse ont alors connu, à nouveau, un développement considérable, particulièrement en Australie où Hatch, Slack et coll., prenant la relève de Kortschak et coll., ont fait à partir de 1965 une analyse biochimique très précise du métabolisme carboné photosynthétique chez plusieurs plantes tropicales dont la canne à sucre. En fait il avait été montré dès 1965 que outre les acides C4, la canne à sucre synthétise à la lumière la plupart, sinon l'ensemble, des intermédiaires du CRPP [Kortschak et al., 1965]. On s'est accordé dans les années qui ont suivi pour distinguer deux types de plantes supérieures d'après la nature des premiers composés marqués par le $^{14}C$ en photosynthèse :

- les plantes C3 qui fixent le $^{14}C$ (du $^{14}CO_2$) dans le PGA, composé à 3 carbones,

- les plantes C4 qui incorporent principalement le $^{14}C$ dans des acides C4, composés à 4 carbones.

D'autres critères distinctifs entre plantes C4 et C3 seront évoqués par la suite.

Un troisième type de métabolisme carboné, connu plus anciennement, est rencontré chez une catégorie de plantes supérieures présentant par ailleurs des structures anatomiques très particulières : les "plantes grasses" ; chez les plantes supérieures dites plantes CAM (de Crassulacean acid metabolism), des acides C4 : malate et aspartate, sont synthétisés à l'obscurité et accumulés dans les vacuoles, puis utilisés comme source de $CO_2$ à la lumière, pour l'évolution de la photosynthèse.

Les plantes C4 présentent des analogies certaines avec les plantes CAM puisque des composés semblables, les acides C4, sont synthétisés dans les tissus des feuilles par fixation du $CO_2$ atmosphérique ; une différence importante entre ces deux catégories de plantes réside dans le fait que la synthèse des acides C4 s'effectue à l'obscurité chez les plantes CAM, et à la lumière chez les plantes C4 [Laetsch, 1971].

Avant d'aborder de façon plus précise l'ensemble des problèmes métaboliques posés par le déroulement de la photosynthèse C4, chez le maïs en particulier, nous complèterons la description des plantes C4 par une étude de leurs caractéristiques biochimiques, anatomiques (concernant la structure et l'ultrastructure des feuilles), et physiologiques.

## CARACTERISTIQUES DES PLANTES C4

### I. CARACTERISTIQUES ANATOMIQUES.

Les feuilles de plantes C4 se distinguent fondamentalement des feuilles de plantes C3 par la disposition des tissus assimilateurs chlorophylliens, lesquels sont arrangés concentriquement en un manchon autour des vaisseaux chez les premières au lieu de la classique dis-

position dorsi-ventrale propre aux feuilles de plantes C3 [Laetsch, 1974]. Haberlandt [1914] donna à cette structure anatomique caractéristique des feuilles le nom de syndrome de type Kranz*. Ce critère particulièrement simple permet de reconnaître aisément la plupart des plantes C4. Deux types de cellules chlorophylliennes peuvent être distinguées par leur morphologie : une couche de grosses cellules jointives, de forme cylindrique entourant le massif vasculaire, constitue la gaine périvasculaire (en anglais, bundle-sheath) ; ces cellules sont elles-mêmes entourées par une ou plusieurs couches de cellules plus petites, de forme arrondie formant le mésophylle. Cette structure de base présente quelques variations qui ont été signalées dans la littérature [Laetsch, 1974 ; Edwards, 1974] ; d'autre part, certaines graminées C3 possèdent une gaine périvasculaire, ce qui est le cas de Phragmites communis : Planche I ; cependant, la disposition des cellules du mésophylle reste anarchique : voir Planche I et Laetsch [1974].

Les cellules de gaine présentent un certain nombre de caractéristiques remarquables. La paroi cellulaire est épaisse, de structure complexe : Laetsch [1971] a mis en évidence une couche de subérine dans la paroi séparant la gaine du mésophylle. Les organites (plastes, mitochondries, peroxysomes) sont particulièrement nombreux et hypertrophiés [voir illustrations pp. 19-20, Black et Mollenhauer 1971]. Ils sont disposés à la périphérie des cellules vers l'extérieur (cas du maïs : position centrifuge) ou en position centripète vers l'intérieur des cellules (cas des Dicotylédones et des Monocotylédones des groupes 2 et 3 - voir plus loin). Les plastes de gaine accumulent l'amidon lors d'un fonctionnement photosynthétique normal ; pour illustration : Farineau [1975a], fig. 1.

* Kranz = couronne (en allemand); il vaut mieux parler de structure en manchon.

Les communications entre les cellules de la gaine et du mésophylle sont facilitées par la présence de plasmodesmes en nombre élevé et à disposition particulière [Laetsch, 1971]. Une formation appelée reticulum périphérique est développée à la périphérie des plastes du mésophylle et de la gaine [Laetsch, 1971]. Elle est rarement rencontrée chez les plantes C3 mais paraît être constante chez les plantes C4 [Gracen et al., 1972 ; Laetsch, 1971]. Le reticulum pourrait favoriser les échanges entre les plastes et le cytoplasme.

En conclusion, l'ensemble des dispositifs anatomiques que nous venons de décrire, ainsi que l'arrangement caractéristique en manchon des tissus assimilateurs autour des vaisseaux semblent faciliter les échanges de composés dans un sens radial : entre mésophylle et vaisseaux via la gaine et inversement entre gaine et mésophylle.

Nous signalerons un caractère particulier rencontré chez un groupe de plantes C4 auquel appartient le maïs, la réduction de la taille des granas dans les chloroplastes des cellules de la gaine [Laetsch, 1971 ; Pyliotis et al., 1971 ; Brangeon, 1971]. Downton, [1970] a montré que les plantes C4 à plastes de gaine "agranaires" (à granas rudimentaires) possèdent toujours une très forte activité enzyme malique à NADP, localisée exclusivement dans ces mêmes chloroplastes [Slack et al., 1969]. Enfin, chez ces plantes C4, le malate est le principal produit marqué au terme d'expériences de fixation du $^{14}CO_2$ de courte durée ; Downton distingue les plantes C4 "productrices de malate" (malate formers), dont les plastes de gaine sont agranaires et riches en enzyme malique à NADP, et les plantes C4 "productrices d'aspartate" (aspartate formers) dont les plastes de gaine présentent des granas normalement développés et une activité enzyme malique à NADP réduite ou nulle [Downton, 1970].

## II. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET LEURS IMPLICATIONS ECOLOGIQUES.

Des différences essentielles entre plantes C4 et C3, concernant la physiologie des végétaux en photosynthèse, ont été dégagées en considérant la variation de l'intensité photosynthétique en fonction de différents facteurs du milieu environnant la feuille (pour une étude détaillée de cette question, voir les articles de : Black [1971] et Downton [1971]). L'intensité de la photosynthèse est considérée de façon globale comme une fixation nette de $CO_2$ ou une émission nette d'oxygène. L'optimum de température pour la fixation nette de $CO_2$ se situe à 35-40°C chez les plantes C4 contre 15 à 25°C chez les plantes C3. La saturation lumineuse en photosynthèse n'est atteinte chez les plantes C4 que pour les très forts éclairements correspondant à 50-100% (selon les régions) de l'éclairement solaire : 100 à 120 000 lux., alors que des éclairements de 15 000 lux. sont saturants chez la plupart des plantes C3.

L'effet inhibiteur de l'oxygène sur la fixation photosynthétique du $CO_2$ est observé chez les plantes C3, même pour les faibles tensions en oxygène dans l'atmosphère (inférieures à 20%, teneur en oxygène de l'air). Chez les plantes C4, un tel effet dépressif de l'oxygène sur la fixation du $CO_2$ n'est mis en évidence qu'en atmosphère enrichie en oxygène par rapport à l'air [Poskuta, 1969]. Bjorkman et al. [1968] ont montré que la croissance des plantes C4 n'est pas affectée par une variation de la tension en oxygène dans l'atmosphère entre 0 et 21%.

Illuminées en atmosphère non renouvelée d'air contenant du $CO_2$ (300 ppm), les plantes C4 épuisent complètement le mélange gazeux en $CO_2$ ; en revanche, avec les plantes C3, la teneur en $CO_2$ s'abaisse jusqu'à une valeur constante correspondant au point de <u>compensation pour le $CO_2$</u>. Sa valeur est de 30-70 ppm [Black, 1971, p. 96]. L'in-

terprétation donnée à ce phénomène est la suivante : les plantes C3 rejettent du $CO_2$ à la lumière, ce qui correspond à la manifestation extérieure de la photorespiration. Au point de compensation les intensités des deux phénomènes suivants , l'un consommateur de $CO_2$ : la photosynthèse, et l'autre conduisant à une émission de $CO_2$ : la photorespiration, sont égales. L'absence apparente de photorespiration chez les plantes C4 a fait l'objet de nombreuses investigations. Nous reviendrons sur cette question ultérieurement à propos du rôle joué par l'oxygène en photosynthèse, chez les plantes C3 et C4.

Pour une même intensité photosynthétique, la dépense hydrique d'une plante C4 n'est que 50% de celle d'une plante C3 [Schantz et Piemeisel, 1927].

Ces critères considérés dans leur ensemble montrent que l'optimum de la photosynthèse est atteint chez les plantes C4 seulement pour les forts éclairements, et les températures élevées avec une dépense en eau réduite. Les plantes C4 sont particulièrement bien adaptées aux climats tropicaux ou désertiques chauds caractérisés par une forte insolation, des températures élevées et l'existence d'une période de sécheresse. D'ailleurs, on tend de plus en plus à considérer les plantes C4 comme des xérophytes [Karpilov, 1970$_3$]. Ce caractère les rapproche des plantes CAM, lesquelles sont remarquablement adaptées aux climats arides.

Dans les conditions optimales de photosynthèse, les taux de fixation du $CO_2$ sont particulièrement élevés chez les plantes C4 : 60-100 mg de $CO_2$ assimilé par $dm^2$ et par heure contre 10-35 chez les plantes C3 [Downton, 1971]. Selon Black [1969] ces taux importants expliqueraient la vitesse de croissance très élevée des plantes C4 et la forte productivité de ces végétaux (mesurée par la production de

matière sèche par unité de surface cultivée). Sur un plan écologique, l'aptitude manifestée par les végétaux C4 à une croissance rapide accroîtrait leur compétitivité par rapport aux végétaux C3 [Black, 1969, 1971].

## III. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES ET METABOLIQUES.

Dans leurs travaux de pionniers [Kortschak et al., 1965 ; Hatch et Slack, 1966] ont montré que l'activité photosynthétique C4 aboutit à la fois à une synthèse d'acides C4 et de composés du cycle de Calvin ; intermédiaires phosphorylés et produits finaux (sucres, amidon ...) ; les deux activités de synthèse se déroulent simultanément à la lumière. Nous rappellerons un certain nombre de faits expérimentaux essentiels concernant la fixation du $^{14}CO_2$ en photosynthèse chez la canne à sucre, correspondant à la première publication de Hatch et Slack [1966], puis l'interprétation des résultats faisant ressortir l'intervention d'un ensemble enzymatique complexe.

Les feuilles ont été exposées au $^{14}CO_2$, à la lumière, pendant des périodes de durées variables, selon une technique de charge classique [Voir : Techniques de marquage]. Les auteurs ont observé une accumulation de $^{14}C$ (plus de 80% du $^{14}C$ fixé) dans les acides C4, malique et aspartique, pour des temps d'exposition très courts au $^{14}CO_2$ ; en prolongeant l'exposition au gaz radioactif (20-120 secondes), le marquage des acides C4 décroît en valeur relative alors que celui des composés du cycle de Calvin augmente. Le PGA est le composé du cycle de Calvin le plus marqué au cours de la première minute de l'expérience de charge ; un résultat identique est observé chez les plantes C3 dans le cas d'expériences semblables [Galmiche, 1963]. L'analyse de la répartition de la radioactivité dans les différents atomes de carbone des acides C4 et du PGA a permis d'établir

que pendant les premières secondes d'exposition au $^{14}CO_2$, plus de 90% de la radioactivité est accumulée dans le carboxyle 4 des acides C4 et le carboxyle 1 du PGA. Grâce à une expérience complémentaire consistant à chasser le $^{14}CO_2$ par du $^{12}CO_2$, après 15 secondes d'exposition au gaz radioactif, il a été montré que, au cours de la chasse, l'augmentation de la radioactivité incorporée dans les composés du cycle de Calvin compense exactement la diminution d'incorporation dans les acides C4. Ces résultats suggèrent, en termes de cinétique biologique, que le pool constitué par les carboxyles 4 des acides C4 est le précurseur unique et immédiat du pool des carbones 1 du PGA.

L'interprétation présentée à l'époque du métabolisme photosynthétique C4 est résumée ci-après [voir revue de Hatch et Slack, 1970] ; elle est désormais unanimement acceptée, sauf sur un point essentiel (sur lequel nous reviendrons) correspondant au déroulement de la réaction 3.

L'accepteur primaire de $CO_2$ de la photosynthèse C4 serait le phosphoénol pyruvate (PEP) ; l'oxaloacétate formé (réaction 1) est soit réduit en malate soit transformé en aspartate par transamination (réaction 2). Les acides C4 céderaient leur carboxyle 4 à un accepteur hypothétique à 2 (ou 5) carbones avec formation de PGA et de pyruvate (réaction 3) ; enfin l'accepteur de $CO_2$ serait regénéré par phosphorylation du pyruvate en présence d'ATP et de phosphate minéral. La séquence des réactions est résumée ci-après et les enzymes impliquées ont été indiquées :

$$\text{PEP} + CO_2 \xrightarrow[\text{carboxylase}]{\text{PEP}} \text{oxaloacétate} + P_i \qquad 1$$

$$\text{malate} \xleftarrow[\text{MDH}]{\text{NADP}} \text{oxaloacétate} \xrightarrow[\text{aminotransférase}]{\text{aspartate}} \text{aspartate} \qquad 2$$

$$\text{acide C4} + \text{accepteur C2 (ou C5)} \xrightarrow{\text{transcarboxylase}} \text{PGA} + \text{pyruvate} \qquad 3$$

$$\text{pyruvate} + \text{ATP} + P_i \xrightarrow[\text{dikinase}]{\text{pyruvate phosphate}} \text{PEP} + \text{AMP} + PP_i \qquad 4$$

NADP MDH : déshydrogénase malique à NADP ; $P_i$ : phosphate minéral ; $PP_i$ : pyrophosphate.

La plupart des enzymes catalysant l'ensemble de ces réactions ont été isolées, purifiées et étudiées [Ting, 1971] ; on notera que la PEP carboxylase, l'aspartate aminotransférase, la déshydrogénase malique à NADP ont été également détectées chez les plantes CAM et les plantes C3 mais les activités (ramenées au poids frais de feuille) sont beaucoup plus faibles chez ces dernières que chez les plantes C4 ou CAM [Ting, 1971]. La pyruvate phosphate dikinase n'a pu être mise en évidence chez les plantes C3, mais existe chez certaines plantes CAM [Kluge, 1971]. Donc la caractéristique biochimique importante des plantes C4 paraîssait être la présence d'une transcarboxylase qui aurait fait fonction chez ces végétaux d'enzyme de carboxylation du cycle de Calvin mais cette enzyme n'avait pu être isolée, et son existence restait douteuse à l'époque. La présence de RuDP carboxylase, l'enzyme de carboxylation du cycle de Calvin, avait pu être démontrée dans des extraits bruts de feuilles de canne à sucre ou maïs, mais l'activité trouvée était très faible : 10% de celle observée chez les plantes C3 [Slack et Hatch, 1967 ; Johnson et Hatch, 1968] ; ainsi, au début de nos recherches, le problème de l'origine du PGA photosynthétique était posé. Cependant toutes les enzymes autres que la RuDP carboxylase, impliquées dans le fonctionnement du cycle de Calvin, avaient pu être caractérisées chez les feuilles de plantes C4 ; les activités trouvées devaient permettre un déroulement normal du cycle pourvu que la fourniture du cycle en PGA soit assurée. Par la suite, les travaux de Bjorkman et Gauhl [1969] ont permis de mettre en évidence la présence d'une importante activité RuDP carboxylase dans les cellules de la gaine des plantes C4 ; l'enzyme est difficile à caractériser du fait de la résistance au broyage des parois de ces

cellules. Cette activité, dans les feuilles de plantes C4, étant comparable sur une base chlorophylle à celle trouvée chez les plantes C3, on pouvait alors envisager, sans contestation possible, une origine du PGA photosynthétique par carboxylation du RuDP. Par ailleurs, il a été impossible d'isoler et de caractériser clairement une "transcarboxylase" ; les arguments, souvent très indirects avancés par quelques auteurs en faveur de l'existence d'une telle enzyme : insensibilité au PCMB* de la fixation photosynthétique du $CO_2$ chez le maïs [Samejima et Miyachi, 1971], existence d'une PEP carboxylase thermostable pouvant fonctionner comme transcarboxylase [Pan et Waygood, 1971], n'ont pas paru très convaincants. En 1970, Hatch, dans le cadre d'une nouvelle interprétation du métabolisme carboné photosynthétique C4, Hatch [1971b] a abandonné l'hypothèse de la transcarboxylation et proposé que le PGA soit synthétisé par fixation de $CO_2$ sur le RuDP.

Enfin une caractéristique essentielle des plantes C4 est la présence d'importantes activités enzymatiques de décarboxylation des acides C4 dans les tissus des feuilles.

Downton [1970] avait remarqué (voir plus haut) la concordance entre la réduction de taille des granas chez les plastes de gaine et l'importance de l'activité enzyme malique à NADP dans ces mêmes cellules, chez une catégorie de plantes C4 appelées "malate formers" (plantes C4 productrices de malate). L'activité enzyme malique à NADP est faible chez les "aspartate formers" possédant des plastes granaires dans la gaine ; aussi des décarboxylases ont-elles été recherchées systématiquement chez des espèces appartenant à cette dernière catégorie de plantes C4. Edwards et al. [1971] ont mis en évidence dans les cellules de gaines isolées de certaines espèces C4 (certains Panicum, Sporobolus, etc ..) une enzyme de carboxylation réversible, la PEP

*PCMB parachloromercuribenzoate.

carboxykinase, qui catalyse, en particulier, la décarboxylation de l'oxaloacétate en pyruvate et $CO_2$, en présence d'ATP. Chez d'autres espèces "aspartate formers" ne possédant pas d'activité PEP carboxykinase (cas des espèces C4 d'Amarantus et d'Atriplex, et de certains Panicum), Kagawa et Hatch [1974] ont récemment trouvé une importante activité enzyme malique à NAD, localisée préférentiellement dans les mitochondries des cellules de gaine.

Une nouvelle classification des plantes C4 a été proposée distinguant trois groupes de plantes C4 d'après la nature des décarboxylases présentes dans les tissus des feuilles [Edwards, 1974 ; Gutierrez et al., 1974a ; Hatch et al., 1975]. L'un des groupes : (groupe 1) correspond aux "malate formers" de Downton [1970], caractérisés par la présence de fortes activités enzyme malique à NADP ; les plantes du groupe 2 possèdent une forte activité PEP carboxykinase et aussi une activité enzyme malique à NAD notable ; au groupe 3 appartiennent des plantes dont les cellules de gaines sont riches en activité enzyme malique à NAD.

## PROBLEMES POSES PAR LE DEROULEMENT DE LA PHOTOSYNTHESE C4. DETERMINATION DES LOCALISATIONS CELLULAIRES DES ACTIVITES METABOLIQUES. INTERPRETATIONS.

Les premières études effectuées sur la feuille de plante C4 de 1965 à 1970, ont démontré le déroulement de deux activités métaboliques distinctes pendant la photosynthèse :

1) la synthèse et la dégradation des acides C4 ;

2) le déroulement du cycle de Calvin.

Il est,d'autre part, admis que le $CO_2$ atmosphérique est incorporé d'abord dans les acides C4 puis restitué, au sein des tissus des

feuilles, grâce à la décarboxylation de ces derniers composés, pour être finalement fixé dans le PGA [Hatch et Slack, 1966 ; Hatch, 1971b]. Toutes les enzymes du cycle de Calvin, y compris la RuDPC (RuDP carboxylase) ont été détectées dans les feuilles de plantes C4, ce qui a conduit à supposer un fonctionnement normal du cycle. Les études ont alors porté sur l'analyse fine du déroulement du processus photosynthétique C4 in situ, au niveau cellulaire : de façon précise, les auteurs se sont efforcés de localiser chaque activité métabolique dans les cellules du mésophylle et de la gaine périvasculaire. Les résultats obtenus ont permis de démontrer l'existence de compartiments d'activité métaboliques. Nous rapportons dans les pages qui suivent les résultats et leur interprétation. Beaucoup de données expérimentales et d'interprétations étant controversées, nous avons fait une présentation contradictoire détaillée de la plupart des travaux marquants effectués dans ce domaine.

## I. FAITS EXPERIMENTAUX ETABLISSANT L'EXISTENCE D'UNE COMPARTIMENTATION DES ACTIVITES METABOLIQUES. CRITIQUE DES RESULTATS.

### 1. Localisation cellulaire des activités enzymatiques.

#### a) Méthodes d'études.

Les déterminations d'activités enzymatiques ont été effectuées sur des fractions enrichies en plastes et cytoplasme de cellules de mésophylle ou de gaine ; les préparations étaient réalisées soit à partir de feuilles entières ou de cellules isolées.

- Isolement de fractions à partir de feuilles entières.

Slack et al. [1969] ont préparé des fractions brutes de feuilles de maïs par broyage (homogénéiseur à palettes), puis réalisé la séparation des plastes de gaine et de mésophylle par centrifugation sur gradient de densité en milieu non aqueux.

Des auteurs anglais [Bucke et Long, 1971 ; Baldry, Bucke et Coombs, 1971], ont développé une technique de broyage progressif (ou séquentiel) pour isoler des fractions enrichies en contenu de cellules de mésophylle ou de gaine (maïs, canne à sucre). Il est possible, grâce à un broyage ménagé au mortier, de libérer le contenu des cellules de mésophylle dont les parois sont aisément déchirées ; ensuite un broyage plus poussé permet d'éliminer plus ou moins complètement les cellules de mésophylle et d'obtenir des préparations assez intactes de gaines périvasculaires. Le contenu des cellules de gaine est libéré par broyage énergique en présence de sable ou de billes de verre.

La mesure des activités enzymatique est effectuée dans les diverses fractions (4 généralement) obtenues successivement.

- Isolement de fractions à partir de cellules isolées.

Comme l'a souligné Black [1973] l'inconvénient majeur de la technique de broyage séquentiel est son empirisme : les opérations manuelles de broyage sont difficilement reproductibles ; d'autre part, il n'existe pas de critère sûr permettant d'apprécier l'importance des contaminations lorsqu'on dispose d'extraits bruts de mésophylle ou de gaine.

Une approche expérimentale moins critiquable a été recherchée. Celle-ci consiste à préparer des cellules isolées intactes et physiologiquement actives de gaine et de mésophylle. Edwards et Black [1971] ont mis au point une technique de préparation de cellules isolées de gaine et de mésophylle chez Digitaria sanguinalis (Graminée) par simple broyage au mortier.

D'autre part, Kanai et Edwards [1973] ont réussi à obtenir par digestion enzymatique des préparations très pures de protoplastes de mésophylle et de gaine périvasculaire chez une grande variété

de plantes C4 dont le maïs. Les extraits bruts préparés à partir de ces cellules - et en particulier à partir des protoplastes de mésophylle - sont exempts de toute contamination [Kanai et Edwards, 1973].

b) Résultats.

Les premières déterminations de localisation d'activités enzymatiques ont été effectuées sur des préparations renfermant des plastes de cellules de gaine ou de mésophylle, isolées à partir de feuilles de maïs [Slack, 1969 ; Slack et al., 1969]. Les activités PEP carboxylase (PEPC), malate déshydrogénase (NADP), adénylate kinase et pyrophosphatase n'ont pu être détectées que dans les fractions contenant les plastes du mésophylle. En revanche, les activités RuDP carboxylase (RuDPC), phosphoribulokinase, phosphoribose isomérase et FDP aldolase, sont strictement associées aux plastes de gaine. Enfin, deux enzymes impliquées dans la réduction du PGA en trioses phosphate, la 3 phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase (NADP) et la 3 phosphoglycérate kinase sont présentes dans les deux types de plastes. On doit noter, en ce qui concerne la RuDPC, que l'activité trouvée par Slack et coll. était très faible (10% de celle des plastes de plantes C3, sur une base teneur en chlorophylle).

Dans ce qui suit, nous restreindrons la discussion au sujet de la localisation des 2 carboxylases, la PEPC et la RuDPC, dans les tissus des feuilles.

En ce qui concerne la PEPC, l'accord est unanime chez les auteurs pour admettre une stricte localisation de l'enzyme dans les cellules du mésophylle [Bucke et Long, 1971 ; Huang et Beevers, 1972 ; Hatch et Kagawa, 1973 ; Gutierrez et al., 1974b]. En revanche, l'interprétation des expériences destinées à mettre en évidence et mesurer

une activité RuDPC dans les cellules du mésophylle ou de la gaine, a longtemps donné lieu à de vives controverses entre chercheurs. Nous examinerons d'abord les données expérimentales fournies par l'emploi de la méthode de broyage séquentiel pour la préparation d'extraits bruts de feuilles. Bucke et Long [1971] ; Baldry et al. [1970] observent une localisation préférentielle de la RuDPC dans des fractions de feuilles enrichies en contenu de mésophylle (cytoplasme et plastes) ; une activité RuDPC faible est pourtant mise en évidence dans les extraits de gaine. Selon les auteurs précédents, l'addition au milieu d'extraction de composés à groupement-SH (β mercaptoéthanol, thioglycolate) est nécessaire pour protéger au cours du broyage la RuDPC contre la dénaturation provoquée par des produits d'oxydation des phénols (oxydations catalysés par des phénols oxydases). Bucke et Long [1971] suggèrent que les tentatives de caractérisation de la RuDPC dans les extraits bruts de mésophylle (par exemple dans les expériences de Slack et al. [1969]) ont échoué parce que des précautions insuffisantes étaient prises pour limiter l'inactivation enzymatique. Cependant, et ce sera la critique fondamentale souvent faite aux auteurs anglais, on doit remarquer que les activités RuDPC mesurées dans les fractions sont très faibles : 1-3 µmoles de $CO_2$ fixé par mg Chl et par heure (voir tableau 1, [Baldry et al., 1971]). Dans le but de vérifier les résultats expérimentaux de [Bucke et Long, 1971], la technique de broyage progressif a été reprise par d'autres auteurs

pour isoler des fractions enrichies en contenu cellulaire de mésophylle. Huang et Beevers [1972] observent chez le sorgho, espèce voisine du maïs, une localisation préférentielle de l'activité RuDPC dans les fractions enrichies en plastes de cellules de gaine. Les auteurs utilisent le dithiothreitol comme agent protecteur des enzymes à groupement SH, lequel selon Baldry et al. [1970] serait beaucoup moins efficace que le β-mercaptoéthanol. Poincelot [1972] a repris la technique de broyage progressif de Bucke et Long [1971] et pu mettre en évidence chez le maïs une activité RuDPC sensiblement égale dans le mésophylle et la gaine. L'activité récupérée dans les fractions est forte (160 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$) et représente 90% de l'activité trouvée dans des extraits de feuilles sur une base teneur en chlorophylle. Le β-mercaptoéthanol est utilisé comme agent protecteur. Poincelot admet une répartition sensiblement égale d'activité RuDPC entre les deux catégories de cellules mais l'auteur ne tient pas compte d'une contamination possible des fractions mésophylle par le contenu des cellules de gaine. Or l'activité RuDPC des extraits de gaine est trois fois supérieure à celles du mésophylle sur une base teneur en chlorophylle des fractions (tableau II Poincelot [1972]). Poincelot, d'autre part, indique une teneur en chlorophylle trois fois plus faible dans la gaine que dans le mésophylle (25% dans la gaine - 75% dans le mésophylle). Or le chiffre de 25% est faible : les valeurs citées dans la littérature sont 37% [Ku et al., 1974a] ou 40-43% [Kanai et Edwards, 1973]. Les résultats de Poincelot peuvent être corrigés ;

si l'on admet l'absence de contamination des fractions de gaine par le mésophylle (en première approximation), on trouve des répartition d'activité RuDPC suivantes :

- 23% (pour le mésophylle) - 77% (pour la gaine) en admettant une répartition de teneur en chlorophylle de 63% dans le mésophylle et 37% dans la gaine.

- 13% (mésophylle) et 87% (gaine) pour une répartition de chlorophylle : 57% dans le mésophylle et 43% dans la gaine.

Ainsi il est possible de soutenir sérieusement, semble-t-il, l'hypothèse de la présence d'une activité RuDPC notable dans le mésophylle représentant 13-23% de l'activité RuDPC totale des tissus de la feuille.

Nous présenterons enfin comme dernière pièce au dossier complexe de la localisation de la RuDPC dans les cellules des feuilles, les déterminations d'activité effectuées sur des fractions préparées à partir de cellules isolées soit par broyage mécanique ou par digestion enzymatique [Edwards et Black, 1971 ; Chen et al., 1973 ; Kanai et Edwards, 1973 ; Ku et al., 1974b]. L'activité RuDPC dans les extraits de mésophylle (cellules ou protoplastes) est voisine de zéro ; cependant le dithiothreitol a toujours été choisi comme agent protecteur pour la préparation d'extraits bruts. En revanche, une très forte activité RuDPC est mise en évidence dans les cellules de gaine (200-700 µmoles de $CO_2$ fixé par mg de Chl et par heure), ce qui est compatible avec un déroulement normal de la photosynthèse, les intentés photosynthétiques de fixation du $CO_2$ atteignant des valeurs de cet ordre chez la feuille entière. On note aussi que, chez les plastes de gaine renfermant 40-50% de la chlorophylle totale des feuilles, l'ac-

tivité RuDPC est, sur une base chlorophylle, 2-2.5 fois plus importante que dans des extraits bruts totaux de feuille, ce qui semble indiquer que l'activité enzymatique est bien concentrée dans la gaine [Kanai et Edwards, 1973 ; Ku et al., 1974b].

Enfin dans une publication récente, Ku et al. [1974b] présentent des analyses d'activité RuDPC effectuées chez Pennisetum purpureum, espèce choisie en raison de la faible teneur de ses tissus foliaires en phénol oxydases (voir aussi Coombs et Baldry [1972]). L'activité RuDPC des protoplastes de mésophylle est voisine de zéro (tableau 1, [Ku et al., 1974b]). Dans les extraits bruts de Pennisetum, l'addition d'agents protecteurs (dithiothreitol, polyvinylpyrrolidone) n'augmente pas l'activité RuDPC. De plus, chez les espèces riches en phénols et phénol oxydases, les mêmes composés SH n'augmentent qu'assez faiblement l'activité RuDPC d'extraits bruts et les phénols sont détectés aussi bien dans le mésophylle que dans la gaine. Ainsi l'hypothèse de Bucke et Long [1971] selon laquelle des composés phénoliques exerceraient une action sélective d'inhibition sur la RuDPC du mésophylle serait à rejeter selon Ku et coll.

Conclusion : Localisation des enzymes du métabolisme C4.

Il semble impossible de donner actuellement une conclusion définitive au sujet de la localisation de la RuDPC dans les deux catégories cellulaires de feuilles de plantes C4. A partir des résultats de Poincelot [1972] et de l'ensemble des résultats récents obtenus sur des cellules ou protoplastes

isolés par voie enzymatique, une position prudente serait de considérer que l'activité RuDPC des plastes de mésophylle, chez le maïs au moins, ne représente que 10-25% au maximum de l'activité totale de la feuille. En ce qui concerne les autres enzymes importantes du métabolisme C4, faute d'études contradictoires, nous nous rallions aux résultats obtenus récemment par Ku et al. [1974b] ; Kanai et Edwards [1973], confirmant d'ailleurs ceux de Slack et al. [1969].

Seraient strictement localisées :

- dans le mésophylle : la PEPC, la malate deshydrogénase (NADP) la pyruvate phosphate dikinase
- dans la gaine : l'enzyme malique (NADP) et les autres décarboxylases (PEP carboxykinase, enzyme malique à NAD) ; la phosphoribulokinase, la phosphoribose 5 isomérase, la FDP aldolase.

En revanche, seraient plus ou moins également distribuées entre gaine et mésophylle :

- la phosphoglycéraldéhyde deshydrogénase et la 3 phosphoglycérate kinase ; les aminotransférases.

Remarque :

Certains résultats expérimentaux viennent confirmer l'absence (ou la réduction extrême) d'activité RuDPC dans les plastes du mésophylle.

Black et al. [1972] signalent que la fraction I du stroma plastidial, caractérisée en ultracentrifugation analytique par un pic de coefficient 18S n'a pu être mise en évidence dans les plastes du mésophylle de Digitaria sanguinalis.

Magomedov et al. [1973] ont trouvé une faible activité RuDPC dans les plastes du mésophylle de la première feuille de plantules de maïs de 6 jours. En revanche, chez des feuilles plus âgées

(14 jours) les auteurs ont échoué dans leur tentative de mettre en évidence l'enzyme dans les plastes du mésophylle.

2. Etude du métabolisme carboné photosynthétique et des activités photochimiques effectuée sur des systèmes isolés : plastes ou cellules.

Les préparations de cellules isolées de mésophylle ou de gaine, exemptes de contamination, obtenues par broyage ou macération enzymatique [Woo et al., 1970 ; Edwards et Black, 1971 ; Kanai et Edwards, 1973] représentent un matériel de choix pour l'étude de la phototoassimilation du $CO_2$ par l'une et l'autre des catégories cellulaires de feuilles de plante C4. Une réserve doit cependant être faite concernant la possibilité d'une altération des cellules au cours de leur isolément comme nous l'avons déjà signalé.

Nous rapportons dans les pages qui suivent des études relatives à la photoassimilation du $CO_2$ sur des systèmes isolés : cellules ou plastes isolés de ces cellules par broyage. Pour approfondir l'interprétation des résultats, nous avons également présenté une étude des activités photochimiques et de photophosphorylation des plastes de mésophylle ou de gaine effectuée soit sur les préparations cellulaires elles-mêmes (sur les cellules intactes) ou sur les plastes isolés.

A. Activités photochimiques et de photophosphorylation des plastes de mésophylle et de gaine.

a) Cas du maïs et des plantes du groupe 1

(Digitaria s., canne à sucre, etc ...)

- Mésophylle

Les activités photochimiques du photosystème I et du photosystème II ont été déterminées sur des préparations de plastes isolés de mésophylle en suivant la réduction d'oxydants appropriés sous éclai-

rement. Les activités du *PS I, du PS II et de photophosphorylation cyclique et non cyclique des plastes du mésophylle sont en tout point comparables à celles des plastes d'épinard [Andersen et al., 1972 ; Anderson et al., 1972]. Ku et al. [1974a] ont mesuré l'activité réductrice du PS II au sein des protoplastes du mésophylle en utilisant un oxydant de Hill qui pénètre aisément dans les cellules : la p-benzoquinone ; chez le maïs la vitesse de réduction de l'oxydant à la lumière est de l'ordre de 600 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$.

Deux composés d'importance physiologique essentielle : l'oxaloacétate et le 3 PGA sont réduits par les plastes de mésophylle avec une émission concomitante d'oxygène : Hatch et Kagawa [1973] (plastes de maïs), Salin et al. [1973] (cellules de Digitaria s.). Chez cette dernière espèce, le $CO_2$ est fixé par les cellules en présence de PEP avec émission d'oxygène dans un rapport stoechiométrique de 1 ; les auteurs montrent que le produit de la réaction de carboxylation est l'oxaloacétate (voir plus loin).

Gaine

Les plastes agranaires isolés de maïs et de sorgho ont une activité réductrice du PS II très limitée:11%-19% de celle des plastes du mésophylle [Anderson et al., 1971b]. Corrélativement, l'activité de photophosphorylation non cyclique, en présence d'un oxydant de Hill est également beaucoup plus faible que chez les plastes de mésophylle [Anderson et al., 1971a]. Les activités du photosystème I ou de photophosphorylation cyclique sont normales, voire plus élevées que chez les plastes de mésophylle sur la base de la teneur en chlorophylle des organites [Anderson et al., 1971a]. L'existence d'une déficience d'activité du PS II chez les plastes "agranaires" de maïs et de sorgho a été mise en doute par Smillie et coll. [Smillie et al., 1972b ; Bishop,

*PS : photosystème.

1974]. Ces derniers auteurs ont montré que l'activité du PS II des plastes "agranaires" présente la propriété de ne pas être saturée aux très forts éclairements : 150 000 ergs.cm$^{-2}$.s$^{-1}$ et plus ; dans ces conditions expérimentales, une activité réductrice équivalente, voire supérieure à celle des plastes de mésophylle peut être mise en évidence avec les plastes de gaine.

Si l'on se rapporte aux données chiffrées de Smillie et al. [1972b] figure 5, concernant le maïs, on constate que pour un éclairement de 50 000 ergs.cm$^{-2}$.s$^{-1}$ qui sature l'activité du PS II des plastes de mésophylle, l'activité correspondante des plastes de gaine n'atteint que 40-50% de celle des plastes précédents. On lira attentivement les deux publications suivantes [Anderson et al., 1972], [Smillie et al., 1972b], pour trouver une présentation détaillée et contradictoire de la question de l'existence d'une déficience d'activité du PS II dans les plastes de gaine. De plus, il faut tenir compte du fait que l'activité du PS II peut varier considérablement, dans une espèce donnée, d'une plante à l'autre, selon les conditions de culture et d'éclairement auxquelles les plantes furent soumises pendant la phase de croissance [Bishop, 1974].

Cependant beaucoup d'auteurs admettent l'existence d'une déficience d'activité du PS II chez les plastes "agranaires" (ou présentant une réduction des granas). Au sein des plantes C4 du groupe 1, la déficience d'activité du PS II est variable d'une espèce à l'autre, et semble pouvoir être mise en rapport avec la réduction de taille des granas [Ku et al., 1974a]. Ces derniers auteurs sont parvenus à mesurer l'activité réductrice des plastes de gaines in situ en fournissant aux cellules la parabenzoquinone (voir plus haut). Chez le maïs l'activité

trouvée est très faible : 4% de celle du mésophylle (sur une base teneur en chlorophylle des plastes). Cependant les gaines ayant été isolées par digestion enzymatique, on peut douter du bon état du PS II dans les plastes de ce matériel. D'autre part Smillie et al. [1972a] ont montré que les plastes agranaires isolées de maïs, sont incapables de réduire le NADP exogène ; toutefois l'addition de plastocyanine permet de récupérer une activité réductrice notable. Le dernier composé pourrait rétablir une liaison entre les photosystèmes I et II assurée normalement dans les plastes intacts par un composé soluble (pouvant d'ailleurs être la plastocyanine) et qui diffuserait hors des plastes lors du broyage.

- Détermination des teneurs relatives en photosystèmes I et II dans les plastes de mésophylle et de gaine.

Mayne et al. [1974] ont déterminé les concentrations relatives en photosystèmes I et II des plastes de gaine et de mésophylle grâce à une étude de certaines de leurs propriétés physiques : luminescence (caractérisant le PS II), spectres d'émission de fluorescence à 77°K (permettant d'évaluer les contributions respectives des PS I et II); enfin le dosage du P 700 par une méthode spectrophotométrique renseigne sur la concentration en centres photochimiques du PS I dans le matériel étudié. Les plastes agranaires montrent un enrichissement relatif en PS I (et un appauvrissement en PS II). En tenant compte de la répartition de teneur en chlorophylle entre plastes de gaine et de mésophylle (voir plus haut) Mayne et coll. ont calculé la distribution du PS II entre gaine et mésophylle ; chez le maïs 90% du PS II se trouverait localisé dans le mésophylle ; pour le sorgho un chiffre de 95% est fourni.

Ces dernières valeurs sont particulièrement intéressantes car elles renseignent sur les capacités réductrices comparées des deux catégories de tissus chlorophylliens au sein des feuilles.

b) Plantes C4 des groupes 2 et 3

Mayne et al. [1974] ont déterminé la concentration relative en photosystème I et II des plastes de gaine et de mésophylle chez les espèces des groupes 2 et 3. Il apparaît que chez les plantes du groupe 2 (à PEP carboxykinase) le photosystème II est également réparti entre cellules de gaine et de mésophylle ; en revanche, dans le groupe 3 (à enzyme malique à NAD) les cellules de gaine sont enrichies en PS II par rapport à celles du mésophylle (les premières cellules renferment également beaucoup plus de chlorophylle que les secondes [Pyliotis et al., 1971].

Ku et al. [1974a] ont mesuré l'activité réductrice in situ des plastes de protoplastes de mésophylle et de cellules de gaine chez un grand nombre de plantes C4 des groupes 2 et 3. Une certaine déficience d'activité réductrice (PS II) des plastes de mésophylle est observée chez les plantes du groupe 3, mais se trouve compensée par une augmentation d'activité PS II des plastes de gaine chez les mêmes espèces. Ainsi ces résultats confirment ceux de Mayne et al. [1974] présentés plus haut.

B. Photoassimilation du $CO_2$ par les cellules (ou protoplastes) et plastes isolés.

a) Mésophylle.

Les protoplastes (ou cellules isolées chez Digitaria s. [Edwards et Black, 1971]) de mésophylle, ne montrent qu'une très faible capacité à fixer le $CO_2$, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité (vitesses inférieures à 5 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ [Gutierrez et al., 1974b]. Ce résultat est valable pour l'ensemble des plantes C4. L'addition de PEP stimule considérablement la vitesse de fixation du $CO_2$ à la lumière et à l'obscurité : les valeurs citées sont de l'ordre de 200-600 µmol . (mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ [Gutierrez et al., 1974b] et plus de 1000 µmol .(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ chez les cellules de Digitaria s. [Salin et al., 1973]. La lumière ne stimule pas la fixation de $CO_2$ en présence de PEP. Des résultats analogues ont été obtenus avec des plastes isolés ; ceux-ci sont obtenus généralement par broyage ménagé des feuilles (voir plus haut) et ne sont vraisemblablement que très faiblement contaminés par les plastes de gaine [Baldry et al., 1969 ; Guillot-Salomon, 1973 ; Usuda et al., 1974]. Cependant la stimulation de la fixation du $CO_2$ par addition de PEP est beaucoup plus faible qu'avec les protoplastes (ou cellules) isolés puisque les vitesses maximales de fixation du $CO_2$ n'atteignent que 20 µmol .(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ [Usuda et al., 1974]. L'existence d'une telle stimulation est en soi intéressante car elle prouve qu'une activité PEPC notable reste associée aux plastes de mésophylle même après purification des plastes sur gradient de densité de saccharose [Guillot-Salomon, 1973 ; Rathnam et Das, 1975b].

A la différence du PEP, les intermédiaires du cycle de Calvin ne stimulent pas, ou très faiblement, la vitesse de fixation du $CO_2$ par les plastes isolés ou les cellules de mésophylle [Edwards et Black., 1971].

Analyse des composés synthétisés par assimilation du $CO_2$.

L'analyse de la distribution du $^{14}C$ (provenant du $^{14}C$ bicarbonate fourni aux cellules) dans les composés synthétisés par les cellules ou protoplastes fait apparaître que l'oxaloacétate est le principal composé marqué : on retrouve dans ce composé 87,5% du $^{14}C$ total incorporé à la lumière, 97% du $^{14}C$ fixé à l'obscurité chez les cellules de Digitaria sanguinalis incubées en présence de PEP [Salin et al., 1973]. L'oxaloacétate, composé très instable, doit être préservé lors de la fixation des échantillons : il est habituellement piégé sous la forme d'un complexe avec la phénylhydrazine. Le malate marqué ne représente que 10% du $^{14}C$ fixé à la lumière.

Usuda et al. [1975] ont montré que les plastes isolés de mésophylle de maïs incorporent plus de 80% du $^{14}C$ total fixé dans le malate, à la lumière ; un résultat semblable est observé à l'obscurité lorsque les plastes sont incubés en présence de NADPH exogène. Les derniers auteurs ne signalent pas la formation d'oxaloacétate, mais ce composé ne peut être préservé avec la technique de fixation des échantillons utilisée. L'oxaloacétate devrait s'accumuler en l'absence de pouvoir réducteur : à l'obscurité, en absence de NADPH.

En ce qui concerne les intermédiaires du cycle de Calvin, aucun auteur ne signale le marquage de ces composés par le $^{14}C$, autrement qu'à l'état de traces ; selon Edwards et Black [1971], aucun marquage du PGA n'est observé à la lumière chez Digitaria sanguinalis.

Conclusion :

Ces résultats tendent à prouver que la seule activité métabolique des cellules de mésophylle est la synthèse d'acides C4, oxaloacétate et malate ; ce dernier acide est synthétisé à la lu-

mière et ne peut l'être à l'obscurité qu'en présence de NADPH [Usuda et al., 1975].

Le PEP, substrat de la PEPC doit être fourni aux cellules pour qu'une importante activité de synthèse des acides C4 se manifeste. Ainsi on peut envisager qu'in situ, les cellules du mésophylle dépendent de la gaine pour leur approvisionnement en PEP. Ces dernières cellules pourraient en fait fournir au mésophylle du pyruvate provenant de la décarboxylation des acides C4 (malate en particulier), que les plastes de mésophylle pourraient ensuite transformer en PEP par le jeu de la pyruvate phosphate dikinase. Ainsi Hatch et Kagawa [1973] ont mis en évidence la capacité des plastes de mésophylle (maïs, Atriplex spongiosa) à phosphoryler le pyruvate en PEP, avec l'utilisation d'ATP provenant de l'activité de photophosphorylation des plastes. D'autre part, dans une étude publiée récemment Huber et al. [1975] ont montré que les extraits de protoplastes de mésophylle (chez plusieurs espèces C4) voient leur capacité de fixation du $CO_2$ nettement accrue par l'addition de pyruvate ou d'alanine + oxoglutarate.

Aucune activité du cycle de Calvin conduisant à une synthèse d'intermédiaires phosphorylés dont le PGA n'a pu être mise en évidence ; si une telle synthèse existe, ce qui ne peut être exclu, elle est probablement faible.

Remarque :

Les plastes isolés de très jeunes feuilles de maïs (prélevées sur des plantules de 4 jours) montrent une capacité notable à fixer le $CO_2$ : 10-20 (jusqu'à 45) µmoles de $CO_2$ fixé par mg de Chl et par heure [O' Neal et al., 1972]. Le $^{14}C$ du bicarbonate est incorporé presque exclusivement dans les intermédiaires du CRPP. Cependant le matériel utilisé par les auteurs est particulier puisqu'il s'agit de plastes immatures : la différenciation du système lamellaire des plastes est inachevée et la distinction entre plastes de gaine et de mésophylle est difficile, voir [Signol, 1965] ; par ailleurs comme le signale

Black 1973 , les deux catégories de plastes sont libérées ensemble lors du broyage et mélangées. De ce fait le matériel est mal défini.

b) Cellules de gaine.

Les premières études d'assimilation du $CO_2$ ont été effectuées par Edwards et Black [1971] sur les cellules isolées de gaines de Digitaria sanguinalis. Ces cellules ne manifestent qu'une faible capacité à assimiler le $CO_2$, à la lumière : 1 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$. L'addition d'un intermédiaire du cycle de Calvin, le R5P, stimule fortement la fixation de $CO_2$, l'addition d'ADP produit le même effet ; en présence de R5P et ADP donnés ensemble, la vitesse d'assimilation du $CO_2$ à la lumière atteint 70 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ contre 28 à l'obscurité. Cependant, il est vraisemblable que les préparations de gaine étaient contaminées par les cellules du mésophylle ce qui pourrait expliquer la faible stimulation de la fixation de $CO_2$ provoquée par l'illumination, ainsi que le fort marquage de l'oxaloacétate (67% du $^{14}C$ incorporé) ; pourtant un marquage significatif des intermédiaires du cycle de Calvin est mis en évidence dont celui du PGA,

puisque 20% du $^{14}C$ total incorporé est retrouvé dans ce composé.

Des études semblables ont été effectuées sur des cellules de gaines périvasculaires isolées de feuilles soit par broyage [Chollet et Ogren, 1973 ; Usuda et al., 1974] ou par macération enzymatique [Gutierrez et al., 1974b ; Usuda et al., 1975].

Chez les cellules de gaines de maïs, la vitesse d'assimilation du $CO_2$ à la lumière est faible : 1-4 µmol $CO_2$.(mg.Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ ; elle est fortement stimulée (10 fois) par addition de R5P, et beaucoup plus faiblement (2 fois environ) par le PEP [Chollet et Ogren, 1973]. La vitesse d'assimilation du $CO_2$ est 10-60 fois plus importante à la lumière qu'à l'obscurité, et fortement inhibée par la DCMU à la lumière ce qui démontre l'intervention des systèmes photochimiques, dont le PS II, dans le processus d'assimilation du $CO_2$ [Usuda et al., 1975] (expériences conduites en absence de substrats exogènes).

Chez les plantes C4 des groupes 2 et 3 (à plastes granaires), les vitesses d'assimilation du $CO_2$ observées en l'absence de substrats exogènes sont beaucoup plus importantes:20-40 µmol $CO_2$.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ ; une valeur de 103 µmol $CO_2$.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ a même été obtenue avec Panicum capillare (groupe 3) : [Gutierrez et al., 1974b]. Ku et al. [1974a] établissent une correspondance entre la capacité d'assimilation du $CO_2$ des cellules de gaine (en l'absence de substrats exogènes) et l'importance de leur activité réductrice potentielle du PS II.

Distribution du $^{14}C$ incorporé dans les composés.

Assez peu d'informations sont disponibles dans la littérature sur cette question dont nous avons abordé une étude détaillée dans la deuxième partie du mémoire. Chez les cellules de gaines isolées de maïs, 70% du $^{14}C$ incorporé (à partir du $^{14}C$-bicarbonate) est retrouvé dans des intermédiaires du cycle de Calvin, dont 40% dans le PGA, et moins de 10% dans les acides C4 [Usuda et al., 1974, 1975].

Conclusion :

Selon les espèces C4, les cellules de gaine manifestent une capacité d'assimilation du $CO_2$ soit très faible (espèces du groupe 1 - avec des degrés de déficience variables, voir [Ku et al., 1974a]) ou notables (groupes 2 et 3) ; la fixation du $CO_2$ est nettement stimulée par addition de R5P chez les espèces à faible activité réductrice. Une activité cycle de Calvin semble pouvoir se dérouler normalement dans les cellules de gaine, au moins chez les espèces dotées d'une activité réductrice suffisante.

Rôle des décarboxylases dans le déroulement de l'activité du cycle de Calvin chez les cellules de gaine.

La présence dans les cellules de gaine d'enzymes susceptibles de catalyser la décarboxylation d'acides C4 : malate et oxaloacétate, a conduit les auteurs à essayer de mettre en évidence un rôle de ces enzymes dans l'approvisionnement en $CO_2$ des cellules de gaine en photosynthèse. En outre, la décarboxylation du malate libérerait du NADH ou du NADPH (chez les plantes des groupes 3 et 1 respectivement). L'utilisation possible de ce pouvoir réducteur pour le déroulement des activités métaboliques des cellules de gaine a été également recherchée.

- espèces du groupe 2 (riches en PEP carboxykinase).

Les cellules de gaines isolées de Panicum maximum fixent le $CO_2$ à un taux de 320 µmol $\cdot (mg\ Chl)^{-1} \cdot h^{-1}$ en présence d'oxaloacétate et d'ATP (ou d'ADP) ; ce résultat indique la possibilité de l'utilisation du $CO_2$ provenant de cet acide C4 pour assurer l'approvisionnement en $CO_2$ des cellules de gaine [Kanai et Black, 1972], cités par Black [1973].

- espèces du groupe 3 (riches en enzyme malique à NAD).

L'addition de malate + aspartate et oxoglutarate à des cellules de gaines isolées d'Atriplex spongiosa stimule fortement l'émission d'oxygène à la lumière [Kagawa et Hatch, 1974]. Les mitochondries isolées des cellules précédentes produisent du pyruvate lorsqu'elles sont incubées en présence de l'ensemble des trois composés. En fournissant aux cellules isolées du malate 4-$^{14}$C ainsi que de l'aspartate et de l'oxoglutarate, les auteurs ont montré que le carboxyle 4 du malate est incorporé dans les composés photosynthétiques. Kagawa et Hatch admettent que seul le malate peut être décarboxylé par les cellules de gaine étant donné qu'aucune décarboxylase de l'aspartate n'a pu être mise en évidence chez l'espèce étudiée. L'aspartate serait transformé en oxaloacétate par transamination puis l'oxaloacétate serait réduit en malate selon une réaction catalysée par une malate deshydrogénase à NAD - ces deux dernières enzymes ainsi que l'enzyme malique à NAD ont été mises en évidence dans les mitochondries . La réaction de réduction de l'oxaloacétate en malate serait couplée avec la réaction de décarboxylation du malate en pyruvate et $CO_2$ (catalysée par l'enzyme malique à NAD), ce qui permettrait de maintenir une teneur relative non nulle en formes réduites et oxydées du NAD.

En résumé les mitochondries peuvent mener à bien la transformation de l'aspartate en pyruvate et $CO_2$ (avec formation intermédiaire de malate, et synthèse de glutamate à partir d'oxoglutarate) ; le $CO_2$ libéré est utilisable par les plastes de gaines pour le déroulement d'une activité photosynthétique.

- espèces du groupe 1, riches en enzyme malique à NADP.

Les cellules isolées de gaine incubées en présence de malate et de NADP libèrent du $CO_2$ (en provenance du carboxyle 4 du malate) et produisent du NADPH [Huber et al., 1973]. Lorsque du malate 4$^{14}$C

est fourni aux cellules de gaine (maïs, Digitaria), on retrouve le $^{14}C$ incorporé dans les intermédiaires du cycle de Calvin [Dittrich et al., 1973] ; ces faits démontrent, selon les auteurs sus-nommés, la capacité des cellules à utiliser le $CO_2$ provenant de la décarboxylation du malate pour l'évolution du cycle de Calvin.

Huber et al. [1973] admettent également que le NADPH produit lors de la décarboxylation du malate pourrait être utilisé comme source de pouvoir réducteur pour l'évolution de la réaction de réduction du PGA en trioses phosphate, au moins chez les espèces du groupe I présentant une déficience marquée d'activité du photosystème II (voir plus haut). En fait l'existence d'un couplage entre décarboxylation du malate et réduction du PGA, dans la gaine, n'a pas été démontrée. Nous reviendrons sur cette question importante dans la deuxième partie du mémoire. Cependant, par hypothèse, considérons comme admise l'existence de ce couplage et supposons en plus une localisation stricte de la RuDPC dans la gaine et la présence d'une faible activité réductrice dans ces cellules : 10% de la capacité réductrice potentielle de l'ensemble des plastes de la feuille [Mayne et al., 1974]. Il apparaît alors clairement que la fourniture de pouvoir réducteur grâce à la décarboxylation du malate est insuffisante pour permettre l'évolution normale du cycle de Calvin. En effet, si tout le $CO_2$ est transformé en PGA, il se forme alors 2 PGA par $CO_2$ fixé :
$CO_2$ + RuDP $\longrightarrow$ 2 PGA ; si le couplage assure l'utilisation à 100% du NADPH libéré pour la réduction du PGA, il en résulte que, par molécule de malate décarboxylée, un NADPH seulement est formé, ne permettant la réduction que d'une molécule de PGA sur les deux qui sont synthétisées. La faible activité réductrice intrinsèque des plastes de gaine ne devant permettre la réduction que d'une fraction du PGA synthé-

tisé, en conséquence 30-40% du PGA formé ne peut être réduit dans la gaine. Hatch [1971b] a proposé que le PGA produit dans la gaine et qui ne pourrait être transformé sur place, migrerait dans le mésophylle pour y être réduit en trioses phosphate ; le DHAP formé serait transféré en retour dans la gaine ; l'apport de ce composé serait nécessaire pour assurer la régénération du RuDP.

Peu d'arguments expérimentaux permettent d'étayer cette hypothèse dont une critique sera présentée dans la deuxième partie du mémoire.

## II. OXYGENE ET PHOTOSYNTHESE CHEZ LES PLANTES C3 ET C4. DEROULEMENT DE LA PHOTORESPIRATION.

La photorespiration est un processus métabolique dont le déroulement chez les feuilles est caractérisé par des échanges gazeux inverses de ceux observés en photosynthèse : rejet de $CO_2$ et fixation d'oxygène. Il n'est observable qu'aux éclairements de forte intensité et en atmosphère à la fois enrichie en oxygène et pauvre en $CO_2$ [Tolbert, 1971]. Nous avons déjà signalé que les plantes C4 ne présentent aucune manifestation apparente d'un déroulement de la photorespiration.

### A. Chez les plantes C3 :

Selon une interprétation récente [Chollet et al., 1974], le déroulement de la photorespiration devrait être relié à une inhibition par l'oxygène de la photosynthèse. En fait l'effet dépressif de l'oxygène sur l'activité photosynthétique (ou effet Warburg, [Warburg, 1920]) consisterait à la fois :

a) en une stimulation de la production de glycolate (substrat de la photorespiration) au détriment de celui des substrats photosynthétiques - le glycolate est ensuite oxydé avec formation de $CO_2$.

b) en une inhibition directe par l'oxygène de la photosynthèse.

Remarque : Les aspects métaboliques du déroulement du processus de photorespiration étant présentés ici de façon succinte, on pourra se reporter aux revues suivantes pour trouver une étude détaillée critique sur la question : [Tolbert, 1971 ; Zelitch, 1975].

Origine du glycolate :

On admet généralement que deux voies métaboliques conduisent à la synthèse du glycolate (voir aussi [Zelitch, 1975]).

a) le glycolate résulterait de l'oxydation d'un intermédiaire à deux carbones intervenant dans les réactions de transcétolisation (le dihydroxyéthylthiamine pyrophosphate). L'oxydation nécessite des peroxydes ou de l'eau oxygénée qui pourraient être formés lors de l'oxydation de la ferredoxine réduite en milieu oxydant (atmosphère oxygénée).

b) Le glycolate proviendrait du phosphoglycolate, lui-même produit par l'oxydation du RuDP catalysée par une RuDP oxygénase [Lorimer et al., 1973].

$$RuDP + O_2 \rightarrow PGA + Phosphoglycolate$$

La RuDP oxygénase ne serait autre que la RuDPC : l'oxygène pourrait se substituer au $CO_2$ au niveau des sites actifs de l'enzyme dans les conditions expérimentales où le $CO_2$ est limitant et l'oxygène en excès [Bowes et Ogren, 1971 ; Andrews et al., 1973 ; Badger et Andrews, 1974].

Bassham et Kirk [1973] estiment que chez les algues chaque voie fournit 50% du glycolate synthétisé. D'autres auteurs [Bahr et Jensen, 1974] admettent que les activités RuDP oxygénase sont telles qu'il est possible d'envisager une origine quasi exclusive du glycolate par oxydation du RuDP, au moins chez les plantes supérieures.

Inhibition par l'oxygène de la photosynthèse.

L'oxygène pourrait exercer une action inhibitrice directe sur certains transporteurs d'électrons, en particulier au niveau du photosystème I [Heber, 1969]. Une autre hypothèse, plus séduisante, serait de considérer que l'inhibition compétitive de la fixation du $CO_2$ par l'oxygène au niveau des sites de la RuDPC est à l'origine même de la diminution d'intensité photosynthétique observée en milieu oxygéné [Bowes et al., 1971 ; Ogren et Bowes, 1971 ; Chollet et al. 1974].

B. Cas des plantes C4.

Bien que l'on n'ait pas pu mettre en évidence les échanges gazeux caractéristiques de la photorespiration chez les plantes C4 - si l'on excepte les observations montrant des activités extrêmement faibles de rejet de $CO_2$ chez le maïs [Irvine, 1970] ou de fixation d'oxygène 18 [Jackson et Volk, 1970] on peut observer, dans les cellules de gaines, au moins chez certaines espèces C4 (groupes 2 et 3), une abondance de peroxysomes et de mitochondries renfermant les enzymes catalysant l'oxydation du glycolate [Black et Mollenhauer, 1971 ; Osmond, 1971b ; Osmond et Harris, 1971 ; Huang et Beevers, 1972]. Cependant chez les espèces du groupe 1 (à plastes de gaine agranaires) les activités enzymatiques trouvées sont très faibles ; aussi il est permis de penser que le potentiel des cellules à métaboliser le glycolate est très limité. Chollet et Ogren [1972] ont tout de même pu montrer que l'oxygène inhibe la fixation photosynthétique du $CO_2$ chez les cellules de gaines isolées de maïs alors qu'aucun effet Warburg n'est observé avec les protoplastes (ou cellules) de mésophylle [Chollet, 1973]. D'autre part Bahr et Jensen [1974] ont mis en évidence une forte activité RuDP oxygénase - carboxylase dans les cellules de gaine de maïs. L'absence de photorespiration

pourrait être due au fait que, au sein de la feuille, l'activité RuDP oxygénase des cellules de gaine est inhibée par suite de la présence dans ces cellules d'une forte tension en $CO_2$ maintenue par la PEPC (du mésophylle) fonctionnant comme une "pompe" à $CO_2$ [Hatch, 1971b] : le rapport élevé $CO_2/O_2$ (en concentrations) dans la gaine favoriserait la carboxylase au détriment de l'oxygénase [Chollet et al., 1974].

Enfin, le $CO_2$ pouvant être émis grâce à une activité de photorespiration, même faible, pourrait être refixé soit localement, dans la gaine grâce à la RuDPC des plastes, ou par la PEPC des cellules du mésophylle [Osmond, 1971b ; Black, 1973].

## III. DEROULEMENT DE LA PHOTOSYNTHESE CHEZ LES PLANTES C4 : INTERPRETATIONS CONTRADICTOIRES - EXAMEN CRITIQUE DES HYPOTHESES.

Nous avons rapporté dans les pages précédentes une étude critique détaillée de la localisation des différentes activités enzymatiques assurant la synthèse des acides C4 et des intermédiaires du cycle de Calvin pendant l'activité photosynthétique C4. Nous avons également présenté un ensemble de données expérimentales concernant la capacité d'assimilation du $CO_2$ par les cellules isolées (ou les plastes) de mésophylle et de gaine. Certains résultats concernant des points aussi importants que la localisation de la RuDPC, étant encore à ce jour controversés, nous présenterons deux interprétations contradictoires du déroulement de la photosynthèse C4 : les interprétations 1 et 3 ; l'interprétation 2 est un compromis entre les deux mais diffère peu en fait de l'interprétation n° 1.

Nota : Dans le tableau 1 est présenté sous forme d'un résumé-aide mémoire un ensemble de données permettant de caractériser chaque groupe de plantes C4.

Tableau 1

Caractéristiques des 3 groupes de plantes C4

| | Groupe 1<br>Maïs, sorgho, canne à sucre<br>Digitaria, Panicum bulbosum | Groupe 2<br>Pan. maximum texanum<br>Sporobolus .. | Groupe 3<br>Atriplex \ C4<br>Amarantus /<br>Pan. miliaceum |
|---|---|---|---|
| Nature des décarboxylases | Enzyme malique à NADP | PEP carboxykinase | Enzyme malique à NAD |
| Acide C4 accumulant le $^{14}C$ du $^{14}CO_2$ | Malate | Aspartate | Aspartate |
| Acide C4 transporté du mésophylle vers la gaine | Malate ? | Aspartate ? | Aspartate ? |
| Développement des granas chez les plastes de gaine | Réduction des granas | Granas développés | Granas développés |
| Activité du PS II des plastes de gaine | Limitée (voir discussion) | Normale | Normale |
| Fixation du $CO_2$ par les cellules de gaine (en l'absence de substrats) | 1-5* | 20-40 | 20-100 |
| Fixation du $CO_2$ par les cellules du mésophylle (en l'absence de substrats) | Faible | Faible | Faible |
| Activités amino transférases (feuilles)** | + | +++ | +++ |
| Malate déshydrogénase à NADP (mésophylle) | +++ | 0-+ (Faible) | 0-+ (Faible |

*Activités en µmol $.(mg\ Chl)^{-1}.h^{-1}$

**Andrews et al. [1971].

1. Interprétation n° 1

a) Cas du maïs et des plantes du groupe 1 : figure 1 (plantes C4 riches en enzyme malique à NADP, à plastes de gaine "agranaires" et présentant une déficience du PS II).

Le déroulement de la photosynthèse chez ces plantes est caractérisé par la succession dans le temps de deux phases métaboliques distinctes - si l'on considère le devenir d'une molécule de $CO_2$ atmosphérique assimilée par la feuille : 1) Incorporation du $CO_2$ dans le pool d'acides C4 du mésophylle ; 2) Transfert du carbone dans les intermédiaires du cycle de Calvin puis finalement dans les produits finaux de la photosynthèse (sucres, acides aminés, etc ...) ; cette 2ème étape est supposée se dérouler à la fois dans la gaine et dans le mésophylle.

Métabolisme et rôle des acides C4.

Les acides C4 sont synthétisés à partir du $CO_2$ atmosphérique dans le mésophylle. Un rôle essentiel est attribué au malate qui migre dans la gaîne où il est transformé en pyruvate et $CO_2$, ce qui assure la restitution du $CO_2$ atmosphérique au niveau des sites de la RuDP carboxylase. Le métabolisme de l'aspartate est plus mal connu ; nous reviendrons au cours de la présentation de nos résultats sur le rôle métabolique que peut jouer ce composé chez le maïs.

Le pyruvate libéré dans la gaine migrerait ensuite dans le mésophylle pour assurer la régénération du PEP. Selon Karpilov [1970, 1974] le composé C3 transféré ne serait pas le pyruvate mais l'alanine, laquelle est très abondante dans les feuilles de maïs.

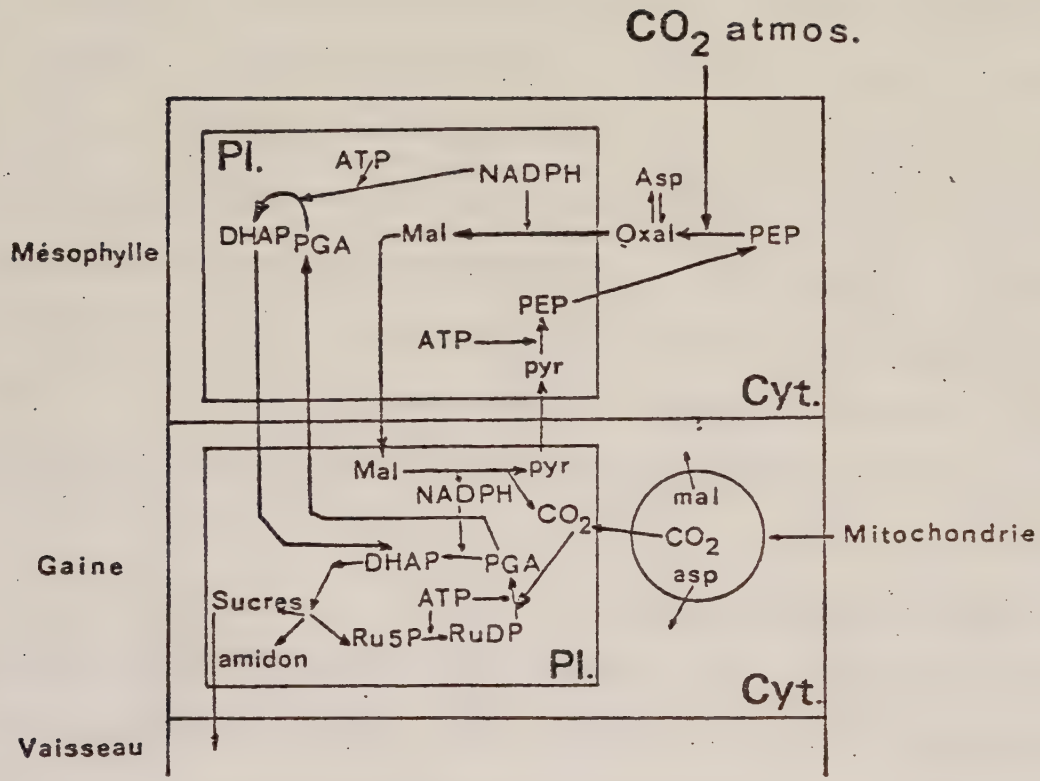



Figure 1

Interprétation n° 1 du déroulement de la photosynthèse chez le maïs (voir texte)

Pl : plaste ; Cyt : cytoplasme ; mal : malate : asp : aspartate ; pyr : pyruvate.

Métabolisme des composés du cycle de Calvin.

Le PGA synthétisé dans la gaine par carboxylation du RuDP est en partie réduit sur place, et en partie dans le mésophylle - comme l'a supposé Hatch [1971b]. Les composés réduits formés dans le mésophylle, et particulièrement le DHAP, retourneraient dans la gaine pour assurer la régénération du RuDP : il est admis que la phosphoribulokinase est strictement localisée dans la gaine. Le NADPH formé lors de la décarboxylation du malate dans les cellules de gaine est utilisé sur place pour la réduction du PGA.

Nous signalerons enfin l'intervention possible de la photorespiration. Le $CO_2$ formé ne serait pas libéré dans l'atmosphère, mais fixé sous forme de composés photosynthétiques : PGA dans la gaine et oxaloacétate dans le mésophylle.

b) Autres plantes C4.

En ce qui concerne les plantes du groupe 3, l'ensemble des résultats obtenus avec Atriplex spongiosa [Hatch et Kagawa, 1973 ; Kagawa et Hatch, 1974] permettent de proposer une interprétation du déroulement de la photosynthèse schématisée dans la figure 2. Les différences essentielles avec le maïs concernent le rôle attribué à l'aspartate ainsi que le fait que les cellules de gaine pourraient mener à bien une évolution complète du cycle de Calvin (à condition d'être approvisionnée en $CO_2$).

L'aspartate, principal acide C4 synthétisé par les cellules du mésophylle [Downton, 1970] serait transporté dans les cellules de gaine. Dans les mitochondries de ces cellules, la transformation de l'aspartate en malate puis la décarboxylation de ce dernier composé assurerait l'alimentation en $CO_2$ des plastes de gaine.

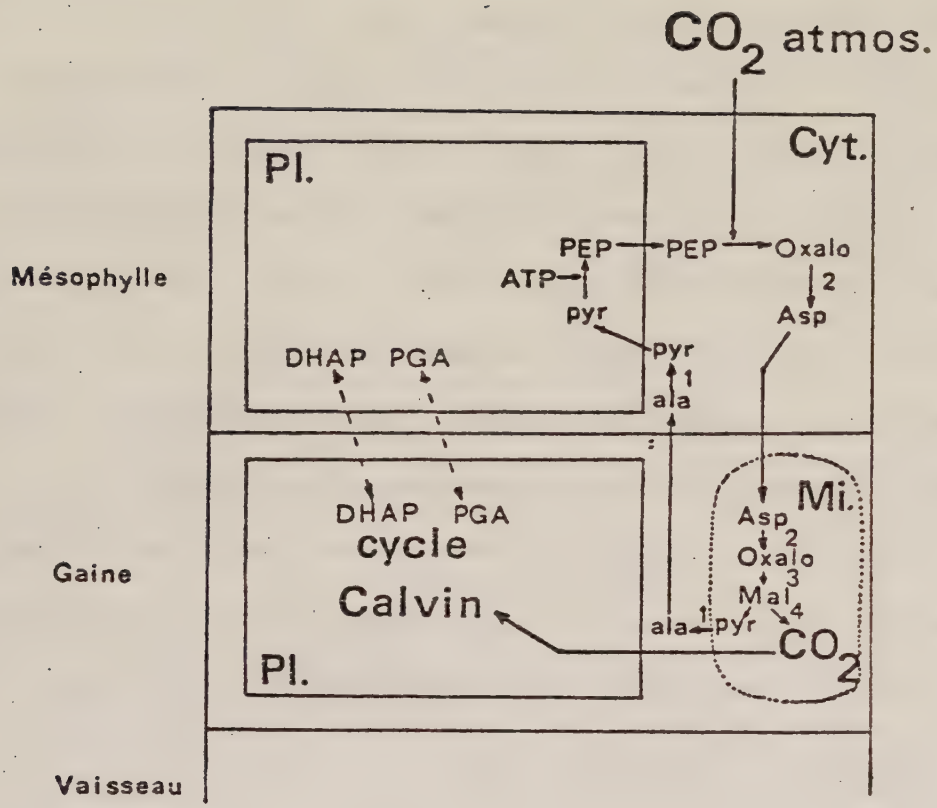



Figure 2 - Interprétation du déroulement de la photosynthèse chez les plantes du groupe 3 (voir texte)

Enzymes : 1 alanine aminotransférase ; 2 aspartate aminotransférase ; 3 malate déshydrogénase (NAD) ; 4 enzyme malique (NAD) ; Mi : mitochondrie

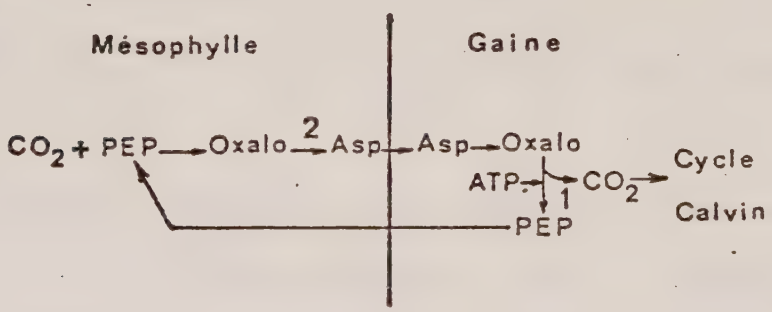



Figure 3 - Interprétation du déroulement de la photosynthèse chez les plantes du groupe 2 (voir texte)

Enzymes : 1 PEP carboxykinase ; 2 aspartate aminotransférase.

La photosynthèse s.stricto (cycle de Calvin) serait exclusivement localisée dans la gaine, les plastes sont en effet dotés d'un PS II normal, et des travaux ont montré que les cellules de gaine isolées peuvent mener à bien une évolution complète de cycle de Calvin sans adjonction de substrats exogènes [Gutierrez et al., 1974b]. Nous avons cependant supposé l'existence d'un échange de PGA et DHAP entre mésophylle et gaine ; ce phénomène pourrait être général chez les plantes C4 par suite de l'existence de communications cytoplasmiques entre catégories cellulaires. Le rôle des plastes du mésophylle serait uniquement de synthétiser le PEP à partir de pyruvate formé dans la gaine et transféré dans le mésophylle ; le pyruvate est probablement transporté sous forme d'alanine.

Chez les plantes du groupe 2, renfermant une activité PEP carboxykinase (mais aussi une activité NAD - enzyme malique notable), beaucoup d'inconnues subsistent en ce qui concerne le déroulement de la photosynthèse. Nous avons schématisé dans la figure 3 l'intervention possible des systèmes enzymatiques. L'aspartate serait l'espèce d'acide C4 transportée (ces plantes sont des aspartate formers). L'oxaloacétate, formé par transamination dans la gaine, à partir de l'aspartate, serait transformé en PEP et $CO_2$ en présence d'ATP : la réaction de décarboxylation est catalysée par la PEP carboxykinase vraisemblablement localisée dans les plastes [Edwards, Kanai et Black, 1971].

En outre l'enzyme malique à NAD pourrait assurer une alimentation complémentaire en $CO_2$.

Comme chez les espèces du groupe 3, les plastes de gaine pourraient mener à bien de façon autonome l'évolution du cycle de Calvin.

En conclusion ; une caractéristique fondamentale du processus de photosynthèse C4 est la compartimentation des deux activités de carboxylation : carboxylation du PEP dans le mésophylle, le $CO_2$ provenant de l'atmosphère, et carboxylation du RuDP dans la gaine, le $CO_2$ incorporé appartenant à un pool interne alimenté par la décarboxylation du malate ou de l'oxaloacétate. On admet également que la décarboxylation des acides C4 se déroule dans le compartiment où le RuDP est carboxylé, c'est-à-dire dans les cellules de gaine.

Enfin, les phénomènes d'échanges intercellulaires assurant des relations entre compartiments pendant l'activité photosynthétique, ont une importance toute particulière chez les plantes C4.

2. Interprétation n° 2 (maïs).

L'interprétation que nous proposons, présentée dans la figure 4, est une variante de l'interprétation n° 1 ; la différence essentielle entre elles concerne la présence d'une activité RuDPC notable dans les plastes du mésophylle en accord avec les travaux de Poincelot [1972]. Cependant, comme nous supposons que cette activité RuDPC est faible : 10-25% de l'activité totale de la feuille (Poincelot cite un chiffre de 45% que nous avons critiqué), la contribution des plastes de mésophylle à la synthèse du PGA photosynthétique ne peut être que limitée. Le $CO_2$ fixé par les plastes de mésophylle pourrait être le $CO_2$ atmosphérique gagnant directement les organites par diffusion ou sous forme de bicarbonate, après hydratation catalysée par l'anhydrase carbonique du cytoplasme [Poincelot, 1972 ; Rathnam et Das, 1975b], à moins que le $CO_2$ ne provienne de la décarboxylation du malate ou de l'oxaloacétate selon un mécanisme enzymatique inconnu.

Les cellules de gaine fourniraient l'essentiel du PGA photosynthétique et une fraction du PGA formé dans ces cellules pourrait être réduite dans le mésophylle.

L'interprétation pourrait être étendue à d'autres espèces que le maïs ; cependant on ne dispose pas, pour celles-ci de preuves expérimentales de la présence de RuDPC dans le mésophylle.

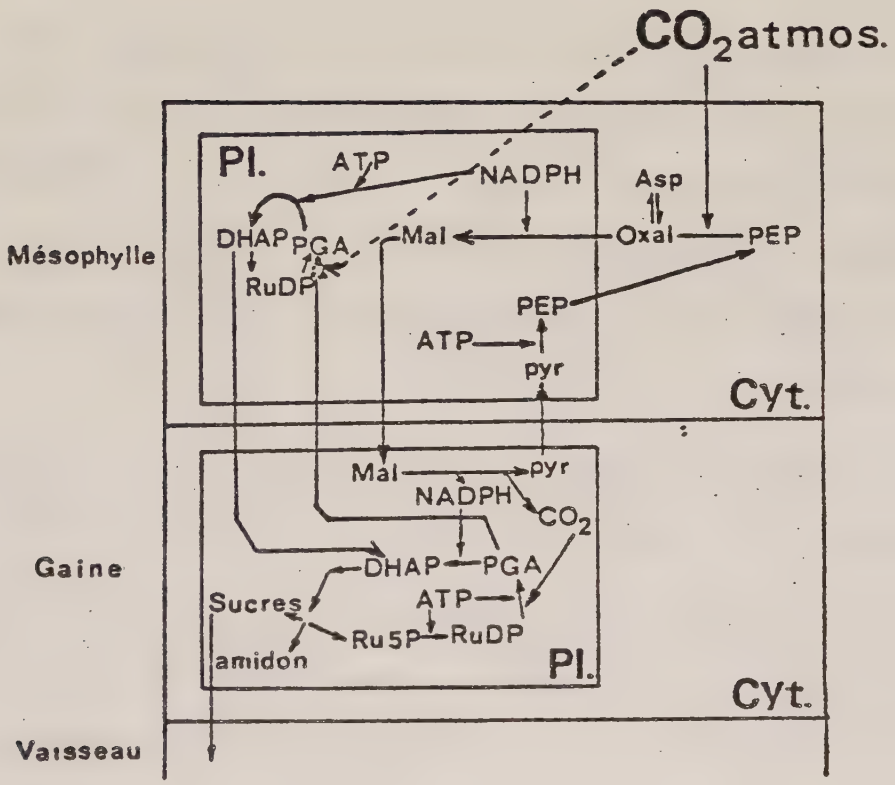



Figure 4

Interprétation n° 2 du déroulement de la photosynthèse chez le maïs (voir texte et figure 1).

3. Interprétation n° 3 (résumée dans la figure 5).

Cette interprétation a été proposée par le groupe de Coombs et al. [Coombs, 1971 ; Bucke et Long, 1971 ; Coombs et Baldry, 1972], en se fondant sur des résultats expérimentaux* que nous avons présentés plus haut. L'interprétation ne s'applique en principe qu'aux espèces étudiées par les auteurs : canne à sucre, maïs, Pennisetum (plantes C4 du groupe 1).

Les auteurs anglais admettent une compartimentation des deux activités métabolique suivantes au sein des cellules du mésophylle :

- synthèse et décarboxylation des acides C4 dans le cytoplasme des cellules ;

- évolution du cycle de Calvin dans les plastes.

Des composés du cycle de Calvin réguleraient l'activité de la PEPC cytoplasmiques (flèches en traits tiretés sur le schéma) [Bucke et Coombs, 1974].

La seule activité métabolique des cellules de gaines serait l'amylogenèse.

Critique des interprétations.

a) critique de l'interprétation n° 1 (figs 1, 2, 3)

Rappelons que cette interprétation admet une compartimentation stricte des activités métaboliques suivantes :

- synthèse des acides C4 dans le mésophylle (cytoplasme et plastes) ;

- décarboxylation des acides C4, refixation du $CO_2$ dans le PGA et évolution (plus ou moins complète selon les espèces) du cycle de Calvin, dans la gaine (plastes).

L'interprétation, admise par la majorité des chercheurs dans le domaine du métabolisme photosynthétique C4, est une synthèse cohérente établie à partir de nombreux travaux récents - 1969 à 1975. Cependant, on est

* localisation d'activités enzymatiques

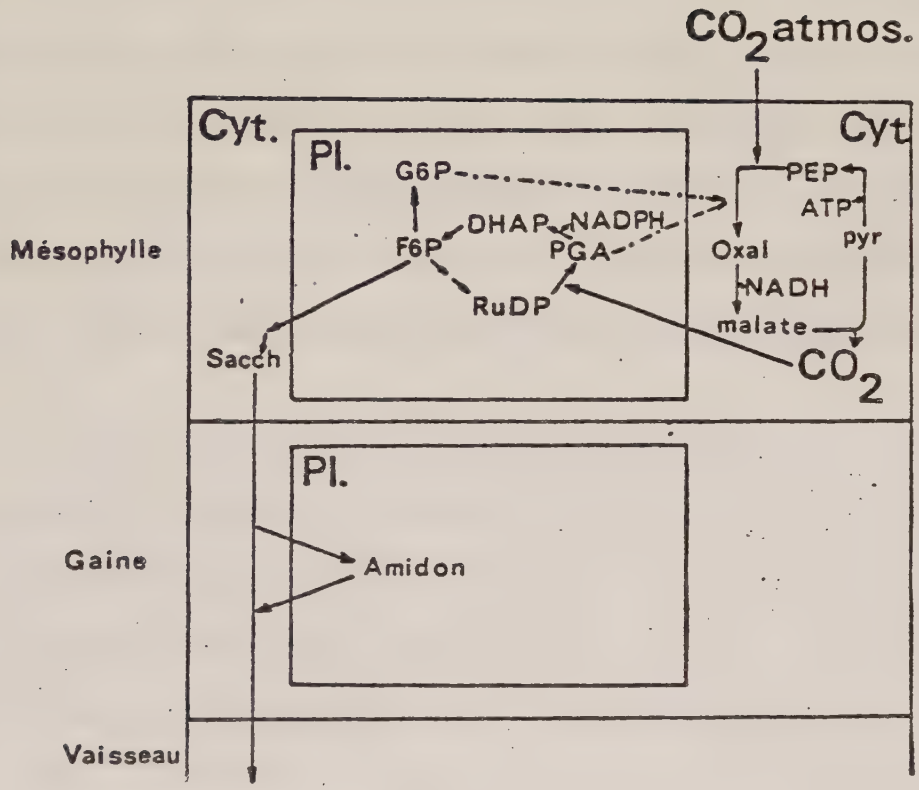



Figure 5

Interprétation n° 3 du déroulement de la photosynthèse chez le maïs (voir texte).

gêné parfois par les complexités des schémas interprétatifs (du type de ceux des figures 1, 2, 3) ; il semble également que les interprétations proposées soient trop strictes et rigides. En ce qui concerne le dernier point, l'absence complète d'activité RuDPC dans le mésophylle choque et comme on ne dispose que de peu d'études directes, sur les plastes isolés de mésophylle, établissant l'absence de l'enzyme (voir remarque, fin du paragraphe I, Introduction-Historique); il paraît plus prudent de considérer que l'enzyme est peut être présente dans les plastes mais n'a pu être caractérisée. Poincelot est le seul auteur ayant fait une analyse quantitative sérieuse (bien que certains résultats puissent être critiqués) montrant la présence de RuDPC dans le mésophylle. L'existence d'un doute quant à la présence de la carboxylase dans le mésophylle, nous a amené à proposer l'interprétation n° 2. Une telle interprétation avait d'ailleurs été suggérée par certains auteurs puis abandonnée par la suite [Karpilov, 1970a, 1974].

Une autre difficulté tient au fait que le déroulement de la photosynthèse C4 suppose des transferts rapides et importants de composés entre mésophylle et gaine (et dans le sens inverse) : acides C4 et pyruvate, DHAP et PGA ; de tels échanges intercellulaires sont inconnus chez les plantes C3. On s'est efforcé de les mettre en évidence chez les plantes C4.; l'examen autoradiographique de coupes de feuilles fixées après seulement deux secondes d'alimentation par du $^{14}CO_2$ en photosynthèse, a montré l'apparition de radioactivité dans les cellules de gaine [Osmond, 1971a] ; cependant les composés marqués n'ont pas été identifiés au niveau cellulaire. Les plasmodesmes, pores des parois cellulaires, sont particulièrement abondants chez les plantes C4 (voir Introduction-Généralités sur les plantes C4) ; ils assurent une véritable continuité cytoplasmique entre gaine et méso-

phylle. Les échanges de composés entre cellules pourraient être le résultat de la diffusion intracytoplasmique de molécules en solution, permise par l'existence de ces pores [Osmond, 1971a]. Ainsi la mise en commun des cytoplasmes [Osmond, 1971a] permettrait d'expliquer de façon simple la rapidité des échanges intercellulaires, en tous sens, de composés, sans qu'il soit nécessaire d'imaginer des processus de transfert beaucoup plus complexes.

Le rôle attribué aux acides C4 en photosynthèse a été l'objet de critiques. Le pool d'acides C4 est-il une simple réserve de $CO_2$ accumulée dans des conditions particulières et pouvant être restituée dans des circonstances physiologiques défavorables (voir Discussion de la publication de Laber et al. [1974]) ? Ou bien ce pool sert-il d'intermédiaire obligatoire entre le $CO_2$ atmosphérique et les composés du cycle de Calvin comme on l'admet généralement. Nous examinerons ce problème dans la première partie du mémoire.

b) Critique de l'interprétation n° 3.

L'interprétation des auteurs anglais permet d'aboutir à un schéma interprétatif extrêmement simple. Seules les cellules du mésophylle, les mieux exposées à l'éclairement solaire, sont supposées jouer un rôle essentiel pendant l'activité photosynthétique ; les cellules de gaine n'auraient pour seule fonction que de synthétiser de l'amidon [Coombs, 1971]. Aucun transfert de métabolites entre cellules, nécessaire à la bonne marche de la photosynthèse, n'est envisagé. Cependant, comme nous l'avons signalé plusieurs fois, de nombreuses critiques graves ont été adressées à cette interprétation. Celle-ci s'appuie uniquement sur des résultats expérimentaux déjà anciens (1970-72), obtenus par une équipe de chercheurs utilisant une méthode d'étude

des localisations d'activités enzymatiques très critiquable : le broyage séquentiel.

Des équipes australiennes et américaines (voir plus haut) ont reproduit les expériences de Coombs et al. et obtenus des résultats assez différents. La méthode de préparation des fractions ne permet pas de déterminer avec précision l'importance des contaminations - des fractions mésophylle par le contenu des cellules de gaine, par exemple: les auteurs anglais n'ont jamais envisagé l'existence de telles contaminations pourtant inévitables avec la technique de broyage utilisée. Enfin les déterminations d'activité enzymatique et les études métaboliques effectuées plus récemment sur des préparations de cellules isolées fournissent des résultats qui vont totalement à l'encontre de l'interprétation des auteurs anglais.

## PROBLEMES DONT L'ETUDE A ETE ABORDEE DANS LE MEMOIRE.

Le but principal poursuivi au cours de nos recherches a été de préciser l'intervention d'un certain nombre d'intermédiaires métaboliques dans le déroulement de la photosynthèse chez une espèce C4, le maïs. A l'époque où nous avons commencé nos investigations, en 1967-68, quelques travaux seulement venaient d'être publiés dans le domaine de la photosynthèse C4, et un déroulement normal du cycle Calvin, au sein de la feuille en photosynthèse active, semblait exclu. Aussi avons-nous dès le début axé nos recherches sur la connaissance du métabolisme des intermédiaires du cycle de Calvin. L'étude des composés photosynthétiques a été complétée par celle des acides C4.

L'approche expérimentale choisie pour l'étude du métabolisme des acides C4 et intermédiaires du cycle de Calvin était inspirée de celle qui a été développée par Calvin et coll., et qui a permis de démontrer le déroulement de certaines étapes du cycle réductif des pentoses phosphate chez les algues en photosynthèse [Wilson et Calvin, 1955 ; Bassham et Calvin, 1957]. Le principe de la méthode consiste à analyser les effets provoqués par des perturbations de la photosynthèse - après installation d'un état stationnaire, sur les tailles des pools des composés impliqués dans le métabolisme photosynthétique (voir Méthodes). Les tailles des pools des intermédiaires phosphorylés du cycle de Calvin ont été évaluées grâce à l'emploi d'une méthode de dosage commode, la méthode d'équilibre isotopique utilisant le $^{32}P$ comme traceur radioactif : à condition de réaliser une séparation convenable de l'ensemble des composés du cycle, ceux-ci pouvaient être dosés à partir d'une mesure de leurs radioactivités respectives dans l'échantillon analysé.

Nous avons rapporté dans la première partie du mémoire une étude des deux activités métaboliques caractéristiques de la photosynthèse C4 : le métabolisme des acides C4 (synthèse et dégradation) et le déroulement du cycle de Calvin. Les feuilles étaient placées en fonctionnement photosynthétique normal ou perturbé.

Dans un premier chapitre est présentée une étude du métabolisme des intermédiaires phosphorylés du cycle de Calvin chez la feuille en photosynthèse normale ou perturbée - soit par arrêt de l'alimentation en $CO_2$, ou par action d'un inhibiteur du photosystème II, le CMU. Nous nous sommes efforcé de démontrer le déroulement de deux étapes essentielles du cycle chez le maïs : la carboxylation du RuDP en PGA, et la réduction de ce dernier composé.

Nous avons abordé dans un second chapitre, le problème de l'intervention des acides C4 en photosynthèse. On admet généralement (voir plus haut, figures 1-5) que ces composés sont des intermédiaires métaboliques entre le $CO_2$ atmosphérique et les composés du cycle de Calvin. Le but poursuivi au cours de nos investigations a été d'abord d'essayer de montrer que le malate et l'aspartate représentent effectivement une réserve de $CO_2$ mobilisable au sein des tissus de la feuille, dans des circonstances particulières : en atmosphère privée de $CO_2$ par exemple. Une activité photosynthétique a été mise en évidence et étudiée chez des feuilles illuminées en atmosphère d'azote pur. Ensuite, le rôle que les acides C4 peuvent jouer dans la transmission du $CO_2$ atmosphérique vers les sites de la RuDPC a été étudié en recourant à un marquage des intermédiaires de la photosynthèse (acides C4 et composés du cycle de Calvin) par une courte exposition des feuilles (en photosynthèse normale ou perturbée) au $^{14}CO_2$.

La deuxième partie du mémoire a été consacrée à une étude de la photoassimilation du $CO_2$ par les cellules de gaines isolées de maïs, destinée à préciser le rôle joué par ces cellules dans le déroulement de la photosynthèse au sein de la feuille entière. A l'époque où nous avons commencé ce travail, en 1971, l'étude directe de l'assimilation du $CO_2$ par les cellules de gaine isolées nous semblait être la seule méthode permettant de confirmer (ou d'infirmer) les hypothèses émises par les auteurs anglais [Coombs, 1971] au sujet de l'absence d'activité cycle de Calvin dans ces cellules. Les résultats antérieurs de Edwards et Black [1971] paraissaient déjà établir l'inexactitude de l'interprétation de Coombs et coll. Nous nous sommes

attaché particulièrement à séparer, identifier et doser les produits du métabolisme photosynthétique des cellules de gaines isolées alors qu'aucun auteur n'avait fait une analyse quantitative poussée dans ce domaine. Nous avons également essayé de démontrer la participation du malate à la fourniture de $CO_2$ et de NADPH, aux cellules de gaines, pour le déroulement de leur activité photosynthétique. Nous nous sommes attaché, en ce qui concerne ce dernier point, à faire une étude quantitative approfondie des composés synthétisés en présence et en absence de malate.

# M A T E R I E L S - M E T H O D E S ET T E C H N I Q U E S

## MATERIELS

Le choix du matériel utilisé pour une étude du métabolisme carboné C4, répondait à plusieurs impératifs qui ont justifié l'emploi du maïs. Il était nécessaire de :

- disposer de matériel en grande quantité et en toutes saisons ; le maïs peut être cultivé en serre toute l'année à condition de fournir un éclairement d'appoint ;

- pouvoir prélever plusieurs échantillons de limbe sur une même feuille ; les feuilles larges et homogènes de plants adultes de maïs (6-8 semaines) permettent le prélèvement de 4 (parfois 6) échantillons comparables sur une même feuille ;

- pouvoir préparer des cellules isolées de mésophylle et de gaine ; si la préparation de cellules isolées de mésophylle par broyage s'est révélée impossible, en revanche des préparations extrêmement pures de gaines périvasculaires isolées ont pu être obtenues à partir de feuilles adultes (Planche II).

Afin de pouvoir interpréter les résultats obtenus sur le maïs, des expériences ont été réalisées avec des matériels témoins. Pour l'étude sur la feuille entière, une graminée C3, Phragmites communis, a été choisie car sa structure de feuille est très proche de celle du maïs (autre graminée) bien que ne présentant pas une structure de type "Kranz" (Planche I). Des préparations très pures de gaines

périvasculaires isolées, ont été obtenues également à partir de feuilles de Panicum texanum Buckl., graminée C4 possédant des plastes de gaines granaires, ce qui a justifié son choix pour une étude comparée avec le maïs, présentée dans la deuxième partie du mémoire.

Culture

Maïs Zea mays L. var INRA 260 a été cultivé en serre chaude, sur terreau, à 22°C, sous éclairement solaire. Un éclairement d'appoint est assuré dans la journée par des lampes à vapeur de mercure HQIL OSRAM de 400 W fournissant environ 2 $mW.cm^{-2}$ de lumière blanche au niveau des feuilles ; la photopériode est de 14 heures. Les expériences ont toujours été effectuées sur les 6ème-10ème feuilles de plants de 6-8 semaines.

Phragmites communis et Panicum texanum Buckl. ont été cultivés en serre dans les mêmes conditions.

## METHODES ET TECHNIQUES

### I. GENERALITES - METHODES D'ETUDE DU METABOLISME PHOTOSYNTHETIQUE PAR APPLICATION DE TECHNIQUES ISOTOPIQUES.

Après un rappel des données essentielles d'ordre biochimique et physiologique concernant le déroulement de la photosynthèse chez des organismes à métabolisme "normal" C3, nous définirons les conditions d'application des méthodes isotopiques auxquelles nous avons eu recours pour l'étude de la photosynthèse ; nous ferons ressortir les possibilités et aussi les limites d'emploi de ces méthodes ; nous insisterons surtout sur une méthode mise en oeuvre pour doser les intermédiaires phosphorylés du cycle de Calvin : la méthode d'équilibre isotopique utilisant le $^{14}C$ et/ou le $^{32}P$.

## A. Rappels

### 1. Le cycle de Calvin.

Entre 1950 et 1955, Calvin et coll. ont montré que, chez les algues et les plantes supérieures, l'assimilation photosynthétique du $CO_2$ marqué au $^{14}C$, pour un temps d'exposition au gaz radioactif de très courte durée (2-5 secondes), conduit à l'incorporation de $^{14}C$ dans un ensemble de composés phosphorylés ; en prolongeant l'alimentation par le $^{14}CO_2$ au-delà de 30 secondes, le $^{14}C$ apparaît dans des produits finaux du métabolisme photosynthétique : sucres, amidon, acides aminés, etc ... [Bassham et Calvin, 1957]. La séquence des réactions responsables du marquage des composés phosphorylés constitue le cycle réductif des pentoses phosphates (CRPP), encore appelé cycle de Calvin : Figure 6.

On subdivise généralement le CRPP en trois phases :

a) l'étape de carboxylation conduisant à la synthèse du 3 phosphoglycérate (PGA) par fixation de $CO_2$ sur l'accepteur de $CO_2$ : le ribulose diphosphate (RuDP) ;

b) l'étape de réduction du 3 PGA en trioses phosphate ;

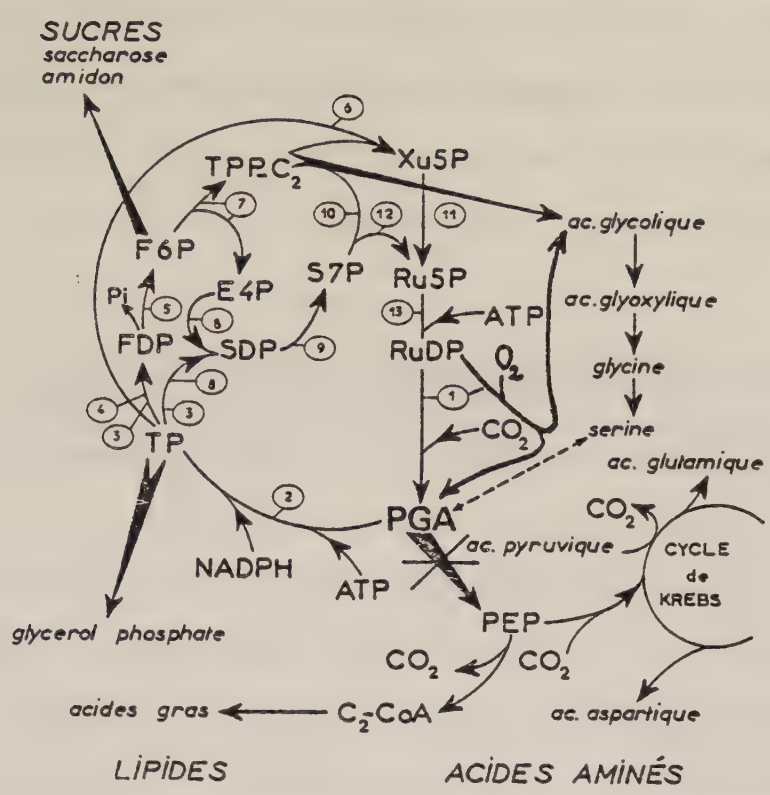
c) la phase de regénération de l'accepteur de $CO_2$.

Le cycle se déroule exclusivement dans le stroma des chloroplastes.

En termes de cinétique biologique, la "machinerie" photosynthétique constituée par les intermédiaires phosphorylés et les enzymes du CRPP est assimilable en première approximation à un ensemble de "compartiments" en série (l'ensemble est fermé car l'accepteur de $CO_2$ est régénéré par fonctionnement du cycle).

Nous rappellerons qu'un compartiment est constitué par un ensemble homogène de molécules ayant la même probabilité de transformation [Galmiche, 1973b]. Ce terme désigne une entité cinétique permettant de construire des modèles de cinétique biologique. Expérimentalement, on n'a accès qu'à des pools* de composés dont il importe de savoir s'ils sont homogènes ou hétérogènes - c'est-à-dire constitués d'un ou de plusieurs compartiments.

* On emploiera également par la suite le terme de "réservoir" comme synonyme de pool.




| COMPOSES | |
|---|---|
| TP | trioses phosphate |
| FDP | fructose 1,6 diphosphate |
| SDP | sédoheptulose 1,7 diphosphate |
| E4P | érythrose 4 phosphate |
| F6P | fructose 6 phosphate |
| TPP-$C_2$ | glycolaldéhyde-thiamine-PP |
| S7P | sédoheptulose 7 phosphate |
| Xu5P | xylulose 5 phosphate |
| Ru5P | ribulose 5 phosphate |
| $C_2$-CoA | acétyl-Coenzyme A |
| Pi | phosphate inorganique |

| ENZYMES | |
|---|---|
| 1 | ribulose diphosphate carboxylase |
| 2 | 3-phosphoglycérate kinase et 3-phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase |
| 3 | triose phosphate isomérase |
| 4 | aldolase |
| 5 | fructose 1,6 diphosphatase |
| 6 | transcétolase |
| 7 | transcétolase |
| 8 | transaldolase |
| 9 | sédoheptulose 1,7 diphosphatase |
| 10 | transcétolase |
| 11 | xylulose 5 phosphate épimérase |
| 12 | xylulose 5 phosphate isomérase |
| 13 | ribulose 5 phosphate kinase |

Figure 6

Cycle réductif des pentoses phosphate (ou cycle de Calvin), d'après [Galmiche, 1973b].

En supposant un déroulement irréversible des réactions du cycle en fonctionnement photosynthétique normal [Galmiche, 1973b], un flux de matière parcourt l'ensemble des compartiments ; l'alimentation en $CO_2$ du compartiment PGA compense les "pertes" de carbone, à différents niveaux du cycle, dues au déroulement des réactions branchées sur le cycle.

2. L'état stationnaire en photosynthèse.

Un organisme photosynthétique (feuille aérienne, algue unicellulaire, etc ..) placé dans des conditions définies et stables d'éclairement, de température, d'alimentation en $CO_2$, atteindra en quelques minutes, un état de photosynthèse stationnaire caractérisé par une vitesse de dégagement d'oxygène constante et égale à la vitesse de consommation du $CO_2$. Les compartiments d'intermédiaires phosphorylés ont alors une taille définie et constante. Une représentation schématique, très simple du système photosynthétique est donnée dans la figure 7 en se limitant à quelques compartiments d'intermédiaires, et en négligeant les fuites de composés. A l'état stationnaire, le flux de matière traversant chaque compartiment A, B, C ... est constant et égal à $k_1A$, $k_2B$, $k_3C$ avec $k_1A = k_2B = k_3C$ ; A, B, C sont les tailles des compartiments (pools de matière en renouvellement) ; $k_1$, $k_2$, $k_3$ sont appelées constantes de renouvellement : ce sont les constantes de vitesse des transformations se déroulant au sein de chaque compartiment, en admettant que les réactions sont d'ordre 1 et monomoléculaires [Galmiche, 1973b].

Un tel modèle est satisfaisant pour l'étude cinétique de la fixation du $^{14}CO_2$ chez la feuille aérienne, pour des temps d'exposition très courts au gaz radioactif : 2-10 secondes [Galmiche, 1973a, 1973b].

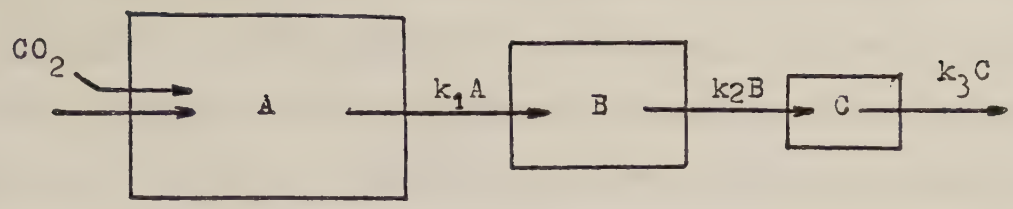



Figure 7

Interprétation en termes de cinétique biologiques du déroulement de quelques réactions du cycle de Calvin. Chaque rectangle représente un compartiment d'intermédiaires du cycle ; A : PGA B : trioses phosphate , C : fructose diphosphate.

En réalité, la notion de compartiment photosynthétique est purement théorique ; la plupart des pools cellulaires d'intermédiaires sont composites (le RuDP excepté) puisque les mêmes composés participent à la fois au déroulement de la photosynthèse et de la glycolyse et se partagent entre deux espaces distincts : le cytoplasme et le chloroplaste. L'étude du métabolisme photosynthétique a cependant permis de montrer que les pools de certains composés (PGA, trioses phosphate) peuvent être considérés comme homogènes du fait de la rapidité des échanges entre espaces de la cellule, et assimilables de ce fait, en première approximation, à des compartiments photosynthétiques [Pedersen et al., 1966 ; Galmiche, 1973a ; Heber, 1974].

3. Rupture d'état stationnaire.

Le déroulement du cycle de Calvin est assuré grâce à une alimentation constante en $CO_2$, provenant essentiellement d'un apport extérieur (et aussi des activités respiratoires) et à la fourniture d'un pouvoir réducteur (NADPH) et phosphorylant (ATP) par le système lamellaire plastidial. Le phosphate n'est pas limitant, dans des conditions physiologiques normales car la quantité de composé mobilisée sous forme de phosphoryles terminaux est constante à l'état

stationnaire, et ne représente qu'une faible fraction (10-30%) du pool cellulaire de phosphate minéral (Première Partie, Chapitre I). Une rupture d'équilibre stationnaire peut être créée soit par arrêt de l'approvisionnement en $CO_2$, ou par arrêt de l'illumination (suppression de la fourniture d'ATP et de NADPH). L'effet de tels traitements sera de rendre limitantes certaines réactions du cycle de Calvin comme la réaction de carboxylation (en absence de $CO_2$) ou la synthèse de composés réduits, lors d'un arrêt simultané des synthèses d'ATP et de NADPH.

B. La méthode des pools.

De telles perturbations produisent des variations de taille des pools cellulaires des composés du cycle de Calvin. Nous traiterons maintenant cette question dans un cadre général.

1. Principe.

Soit une chaîne linéaire de réactions intéressant les composés A, B, C, D, E (figure 8). Chaque composé est représenté par un rectangle dont l'aire est proportionnelle à la taille du compartiment du composé dans l'espace cellulaire où se déroule la réaction.

Supposons qu'une perturbation entraîne le ralentissement de la transformation de C en D. Si l'alimentation du compartiment A en substrat persiste, et que la consommation en composé E continue, la perturbation entraînera une augmentation des tailles des compartiments des composés situés en amont de celle-ci (C, B, A) et une diminution de la taille de ceux qui sont en aval (D, E ...).

Chez un organisme (feuille par exemple), les pools cellulaires sont le plus souvent composites, c'est-à-dire décomposables en plusieurs compartiments. En choisissant un (ou des) traitement(s) susceptibles de perturber spécifiquement une voie métabolique déter-

minée, il sera possible, au moins en théorie, de mettre en évidence des variations de tailles des compartiments intéressés par la perturbation. Ainsi, par l'analyse des effets de perturbations sur les tailles des pools cellulaires de divers composés, on pourra démontrer le déroulement d'une voie métabolique, c'est-à-dire déterminer des filiations métaboliques entre composés. Nous appellerons cette méthode d'étude, la "méthode des pools".

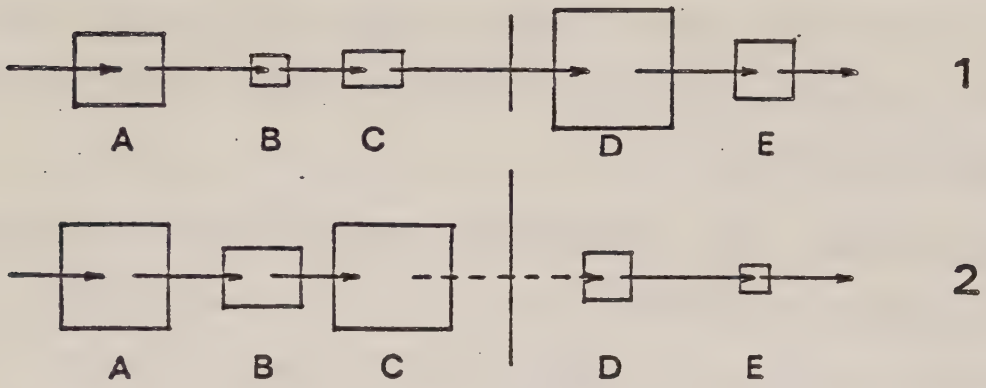



Figure 8

Effet d'une perturbation entraînant le ralentissement de la transformation de C en D, sur les tailles des compartiments A, B, C, D, E. 1 situation initiale ; 2 après perturbation.

La méthode des pools est une méthode d'étude des intermédiaires métaboliques qu'on rapprochera de la méthode de marquage classique utilisant les indicateurs radioactifs : la méthode de charge (voir plus loin). La méthode des pools présente comme avantage de fournir une information directe et univoque (dans beaucoup de cas) sur la taille des compartiments d'intermédiaires impliqués dans une chaîne de transformation métabolique, mais des composés peu abondants seront difficilement étudiés. En revanche la méthode de marquage permet de mettre en évidence un ensemble de composés, même

présents à l'état de trace. Cependant l'interprétation des expériences de marquage est rarement univoque car il est souvent difficile de faire une distinction entre marquage par synthèse nette ou par renouvellement. D'autre part le déroulement de réactions d'échange est à envisager ; ainsi en ce qui concerne la photosynthèse C4 (maïs), si l'incorporation de $^{14}C$ dans l'oxaloacétate ou dans les composés du cycle de Calvin ne peut résulter que d'une incorporation nette de $CO_2$, en revanche le marquage de certains composés peut s'expliquer par le déroulement de réactions d'échange : marquage de l'aspartate par échange avec l'oxaloacétate [Farineau, 1971] ou marquage du malate par "échange" avec le $^{14}CO_2$ dans les cellules de gaine (voir deuxième Partie, [Farineau, 1975b]).

2. Application de la "méthode des pools" à l'étude du cycle de Calvin et de la photosynthèse C4.

a) Etude du cycle de Calvin.

La voie de synthèse des intermédiaires photosynthétiques du CRPP est une chaîne de réactions refermée sur elle-même - un cycle. Les effets d'une perturbation seront plus difficiles à étudier sur un tel système que sur une chaîne linéaire : en effet toute perturbation agissant à un niveau quelconque du cycle retentira nécessairement sur le fonctionnement de l'ensemble des réactions en empêchant progressivement la régénération des intermédiaires. Seules des études cinétiques des variations des pools après installation instantanée d'une perturbation durable devrait, a priori, permettre de visualiser l'intervention des constituants d'une chaîne cyclique. Nous supposons ici que la perturbation est totale : privation totale de $CO_2$ ou arrêt de l'éclairement. Une autre solution peut être adoptée consistant à doser l'effet de cette perturbation de façon à permettre le déroulement d'une activité métabolique réduite mais non

nulle dans le cycle. Nous avons eu recours à ce procédé lorsque l'installation de la perturbation n'est pas instantanée, par suite de l'action d'un inhibiteur par exemple (voir action du CMU, première Partie). Les effets des perturbations ont alors été étudiés après une période relativement longue (plus de 10 minutes) et aucune étude cinétique d'évolution des pools n'a été effectuée.

L'application de la "méthode des pools" à l'étude du CRPP est rendue complexe également par le fait que la plupart des composés du CRPP participent à plusieurs voies de synthèse : les pools cellulaires sont hétérogènes. Ainsi le PGA est impliqué dans le déroulement du CRPP, de la glycolyse et de la photorespiration. Il faudra recourir à un choix judicieux de perturbation pour caractériser l'intervention d'une voie métabolique déterminée, celle du CRPP par exemple.

L'inconvénient majeur de la "méthode des pools" est sa lourdeur, car elle exige la détermination des tailles des pools de nombreux composés, par ailleurs instables et peu abondants. Calvin et coll., qui ont largement fait appel à la "méthode des pools" pour l'étude de la photosynthèse des algues [Wilson et Calvin, 1955 ; Pedersen et al., 1966] ont levé cette difficulté de façon élégante en utilisant les indicateurs radioactifs pour doser les composés en application de la méthode d'équilibre isotopique. Nous avons adopté cette méthode pour la mesure des pools d'intermédiaires du CRPP chez des plantes supérieures C3 et C4.

b) Etude du métabolisme des acides C4.

Certaines perturbations peuvent retentir à la fois sur le fonctionnement du cycle de Calvin et sur le métabolisme des acides C4. Nous avons également appliqué la "méthode des pools" à l'étude du métabolisme des acides C4 à l'état stationnaire ou perturbé. Les acides C4 pouvant fonctionner comme donneurs de $CO_2$ pour les sites

de la carboxylase du cycle de Calvin (Introduction, figures 1-5), une perturbation particulièrement intéressante pour l'étude des acides C4, sera la privation de $CO_2$ à la lumière.

Nota : Pour mesurer les pools d'acides C4, nous n'avons pas eu recours aux méthodes isotopiques.

C. Techniques de marquage des intermédiaires du CRPP ; cas particulier de la méthode d'équilibre isotopique.

1. Généralités.

La technique la plus utilisée pour marquer les intermédiaires du CRPP est la technique de charge consistant à introduire un indicateur nucléaire dans l'organisme, de façon continue pendant la durée de l'expérience, en maintenant constante sa radioactivité spécifique. Le $^{14}C$ est fourni sous forme de $^{14}CO_2$ mélangé à l'atmosphère gazeuse, ou de bicarbonate donné par infiltration ou ajouté au milieu d'incubation (cas des algues). Le radiophosphate est administré de la même manière que le bicarbonate.

2. Théorie.

L'évolution de radioactivité dans un compartiment d'intermédiaire donné, à l'état stationnaire, est déterminée par les entrées et sorties d'indicateurs. Considérons l'exemple précis du compartiment A (constitué par le pool de PGA photosynthétique) alimenté par du $^{14}CO_2$ (Fig. 7).

Nous nous placerons dans le cas particulier où la feuille reçoit une "impulsion" de $^{14}CO_2$ ; $a_o^*$ molécules de $^{14}C$ sont injectées instantanément dans le compartiment et incorporées dans le carboxyle du PGA (dans 50% en fait si l'on admet la stoechiométrie classique de la réaction de carboxylation). L'évolution instantanée de radioactivité dans A sera au temps t, du fait du renouvellement moléculaire :

$$da^* = -k_1 a^* dt \qquad (1)$$

d'où $$\frac{da^*}{a^*} = -k_1 \, dt$$

$a^*$ : nombre de molécules radioactives dans A au temps t ;

$k_1$ : constante de renouvellement du PGA.

On obtient l'évolution de radioactivité au cours du temps, dans le compartiment A en intégrant l'expression précédente, entre les temps 0 (pour lequel $a^* = a_o^*$) et le temps t ; on tire :

$$a^* = a_o^* \, e^{-k_1 t} \qquad (2)$$

il est clair que $a^*$ tend vers zéro pour t infini.

Les deux termes de l'expression (1) peuvent être divisés par A, taille du compartiment PGA à l'état stationnaire ; d'où :

$$d\,\frac{a^*}{A} = -k_1 \, \frac{a^*}{A} \, dt \qquad (1')$$

or $\frac{a^*}{A} = a$ est la radioactivité spécifique du PGA (carboxyle) au temps t.

On tire l'évolution de la RAS du PGA (carboxyle) au cours du temps, soit :

$$a = a_o \, e^{-k_1 \, dt} \qquad (2')$$

$a_o$ est la RAS instantanée au temps zéro.

La RAS du carboxyle tend vers une valeur nulle pour un temps infini. Ce type d'évolution est observé dans les expériences de charge de courte durée ; l'indicateur ($^{14}C$) est donné pendant un temps très court (2-5 secondes) pour marquer un précurseur métabolique (pool de $CO_2$, acides C4 ...) afin de pouvoir suivre ensuite, en absence d'indicateur, l'évolution du marquage de ce précurseur et des composés qui en dérivent ; cette variante de la technique de charge est appelée technique de <u>chasse</u>.

Dans le cas des expériences de charge classiques, l'indicateur est fourni en continu avec une RAS constante ; reprenons l'exemple du marquage du carboxyle du pool de PGA photosynthétique (Figure 7) : le $^{14}CO_2$ est introduit dans le compartiment PGA à une vitesse $V = k_o x^*$, $k_o$ est une constante, $x^*$ est la taille du pool de $^{14}CO_2$ précurseur (entité cinétique). Du fait des entrées et sorties d'indicateurs dans A, l'évolution instantanée de la radioactivité $a^*$ du carboxyle du PGA au temps t est :

$$da^* = (k_o x^* - k_1 a^*)\, dt \quad \text{d'où en posant } k_o x^* = k_1 X^*$$

$$\frac{da^*}{dt} = k_1 (X^* - a^*)$$

On tire l'expression de l'évolution de la radioactivité $a^*$ au cours du temps en intégrant l'expression précédente entre les temps t = 0, sachant que a = 0 pour t = 0 :

$$a^* = X^*(1 - e^{-k_1 t}) = \frac{k_o}{k_1} x^* (1 - e^{-k_1 t}) \qquad (3)$$

Pour un temps infini, on voit que $a^*$ tend vers une valeur finie $a^*_{eq} = \frac{k_o}{k_1} x^*$ : les carboxyles du PGA sont à l'<u>équilibre isotopique</u> avec le $^{14}CO_2$.

Appelons Ca, la taille du compartiment carboxyle du PGA dérivant du $CO_2$, (soit, en ce qui concerne les carbones, 1/6 du compartiment PGA) ; à l'état stationnaire, $k_1 Ca = k_o x$, x étant la taille du pool de $CO_2$ alimentant A : on exprime par cette relation le fait que, à l'état stationnaire, le flux de carbone entrant dans A sous forme de $CO_2$ est égal au flux sortant de A sous forme de 50% des carboxyles. Il vient :

$$Ca = \frac{k_o}{k_1} x$$

En divisant l'expression $a^*_{eq}$ par Ca, on obtient :

$$\frac{a^*_{eq}}{Ca} = \frac{k_o}{k_1}x^* \cdot \frac{k_1}{k_o x} = \frac{x^*}{x} = \text{RAS du } {}^{14}CO_2.$$

$\frac{a^*_{eq}}{Ca}$ , RAS du compartiment carboxyle du PGA dérivant du $^{14}CO_2$, tend vers la RAS du $^{14}CO_2$ d'alimentation.

En considérant les transformations subies par le carbone carboxylique au cours du déroulement du cycle de Calvin, on conçoit aisément que les carbones des différents composés du cycle atteindront également l'équilibre isotopique. Bassham et Kirk [1960] ont montré que le carbone carboxylique du 3 PGA est, chez les algues en photosynthèse active, à l'équilibre isotopique avec le $^{14}C$ du bicarbonate après environ 1 minute : expérimentalement, on constate que la fixation de $^{14}C$ dans le carbone carboxylique du 3 PGA est stationnaire après 1 minute. L'équilibre isotopique est réalisé pour les autres intermédiaires après 5-15 minutes.

On peut fournir le radiophosphate comme indicateur radioactif ; le $^{32}P$ est incorporé par photophosphorylation dans l'ATP, puis est transféré dans le phosphoryle 1 du RuDP et finalement apparaît dans le phosphoryle d'une molécule de PGA sur deux, ce qui nous ramène au cas des expériences avec le $^{14}C$. On conçoit que, en fournissant aux cellules du radiophosphate de RAS donnée et à concentration constante pendant la durée de l'expérience, les phosphoryles des intermédiaires phosphorylés du CRPP soient à l'équilibre isotopique avec le phosphate d'alimentation au bout d'un temps suffisant ; la réalisation de l'équilibre dépend de multiples facteurs tels la vitesse d'entrée du phosphate dans la cellule, la vitesse de dilution du phosphate externe avec le phosphate cellulaire, la vitesse des réactions de photophosphorylations, en particulier.

3. Intérêt de la méthode d'équilibre isotopique.

Elle permet la détermination de la taille d'un pool de composé dont la radioactivité dans un échantillon analysé (feuille à l'équilibre isotopique avec le $^{32}P$ par exemple) est connue ; le pool peut être hétérogène, mais l'ensemble des compartiments qui le constituent doivent être à l'équilibre isotopique.

Supposons que l'on veuille déterminer dans un échantillon végétal, la taille A (nanomoles) d'un pool d'un composé renfermant n atomes à l'équilibre isotopique avec un précurseur de RAS $a_o$ ($a_o$ est exprimé en ipm par nanomole) ; la radioactivité totale incorporée est Q (ipm). Il vient :

$$Q = A \times a_o \times n$$

d'où

$$A = \frac{Q}{a_o} \times \frac{1}{n}$$

L'évaluation d'un pool se ramène à une (ou des) mesure(s) de radioactivité, celle de Q (et éventuellement $a_o$).

Cette méthode suppose que l'on connaisse la RAS de l'indicateur fixé dans les intermédiaires et que l'on puisse séparer convenablement le composé à étudier dans l'échantillon. Or la séparation des intermédiaires photosynthétiques et leur identification peut être réalisée aisément par des méthodes chromatographiques ou électrophorétiques (voir Méthodes de séparation). La RAS de l'indicateur n'est pas toujours connue avec précision ; dans le cas d'expériences conduites avec des cellules isolées, incubées en présence de $^{14}C$ bicarbonate, on admet que la RAS de l'indicateur fixé est celle du bicarbonate du milieu [Bassham et Kirk, 1960]. En revanche, chez des feuilles soumises à une alimentation par infiltration (cas de nos expériences), un gradient de radioactivité se maintient entre la base de l'échantillon au contact de l'indicateur et le sommet (voir plus loin).

LA RAS de l'indicateur au niveau de chaque cellule est inférieure à celle de la solution d'alimentation et non connue.

4. Mise en oeuvre de la méthode d'équilibre isotopique chez des algues en photosynthèse.

La méthode d'équilibre isotopique a été beaucoup utilisée par Calvin et coll. pour étudier le déroulement des principales étapes du CRPP et pour acquérir des informations sur le métabolisme de composés synthétisés à partir d'intermédiaires du cycle (glycolate et phosphoglycolate [Bassham et Kirk, 1973], phosphogluconate [Bassham, 1968]). Des expériences ont été réalisées avec le $^{14}C$ fourni seul ou associé au $^{32}P$ [Pedersen et al., 1966 ; Bassham, 1968].

Les algues sont maintenues en culture dans des conditions stationnaires parfaitement définies d'éclairement, de température, de pH des solutions, de composition du milieu d'incubation et de concentration en $CO_2$ du mélange gazeux circulant [Wilson et Calvin, 1955 ; Bassham et Kirk, 1960]. Le $^{14}C$ bicarbonate (et le radiophosphate, éventuellement) sont injectés dans la culture en photosynthèse stationnaire. Des prélèvements sont effectués dans la suspension à intervalles de temps variables, et les échantillons fixés pour une analyse de la distribution de la radioactivité dans les composés photosynthétisés. L'ensemble des intermédiaires du CRPP est à l'équilibre isotopique avec le $^{14}C$ ou le $^{32}P$ après 10-15 minutes d'incubation avec l'indicateur. On provoque alors des perturbations d'état stationnaire par arrêt de l'illumination ou diminution de la concentration en $CO_2$ dans le gaz circulant [Wilson et Calvin, 1955 ; Pedersen et al., 1966]. L'évolution de marquage des composés est suivie au cours des périodes transitoires précédant l'installation d'un nouvel état d'équilibre. Le marquage par le $^{32}P$ s'est avéré être particulièrement intéressant. Dans le cas d'une transition photosynthèse/obscurité, il

est apparu que la glycolyse assure la production à l'obscurité, d'intermédiaires phosphorylés dérivant du glucose 6 phosphate, formé lui-même par phosphorylation de glucose provenant de l'amidon. Ces intermédiaires de la glycolyse sont à l'équilibre isotopique avec le $^{32}P$, mais ne le sont pas avec le $^{14}C$, étant donné que l'amidon, réserve carbonée immobilisée, n'est pas à l'équilibre isotopique pour des temps d'expérience relativement courts (10-20 minutes).

Ainsi, en utilisant le $^{32}P$ comme indicateur, il est possible d'appliquer la méthode d'équilibre isotopique à la mesure des compartiments d'intermédiaires phosphorylés en dehors de l'état de photosynthèse stationnaire. Notons que dans les expériences de Pedersen et al. [1966] les mesures de radioactivité incorporée dans les composés à l'équilibre isotopique (avec le $^{32}P$) reviennent à des mesures de tailles de pools en renouvellement - donc à l'application de la "méthode des pools". Aussi avons-nous choisi le radiophosphate comme précurseur radioactif des intermédiaires du CRPP pour étudier ces composés chez des feuilles à l'équilibre isotopique en photosynthèse stationnaire et après perturbation de l'état stationnaire.

## II. REALISATION PRATIQUE D'EXPERIENCES A L'EQUILIBRE ISOTOPIQUE AVEC DES FEUILLES AERIENNES.

### A. Matériel.

Les feuilles de maïs ou de Phragmites sont mises à tremper par la base dans une solution de Knop contenant environ 0,5 mCi de radiophosphate par ml, ce qui assure une alimentation prolongée en $^{32}P$. Les feuilles sont placées dans une cellule à atmosphère contrôlée (air humidifié à 70%, température 22°C), sous éclairement continu de 22 h (0,8 $mW.cm^{-2}$ de lumière blanche, tubes fluorescents Phytor,

Lumière du Jour) ; 2 heures avant l'expérimentation (voir ci-dessous) la solution radioactive est remplacée par de l'eau distillée de façon à diminuer le gradient de radioactivité entre la base et le sommet des feuilles.

On prélève des échantillons de limbe (100-250 mg) de part et d'autre de la nervure centrale, à raison de 2 sur une feuille de Phragmites et 4 chez le maïs. Les expériences sont généralement conduites sur 4 lots de feuilles : 4 fragments contigus prélevés sur une feuille chez le maïs (voir Fig. 9) ou 4 lots de 4 demi-feuilles chez Phragmites (fragments prélevés de part et d'autre de la nervure centrale sur 8 feuilles.

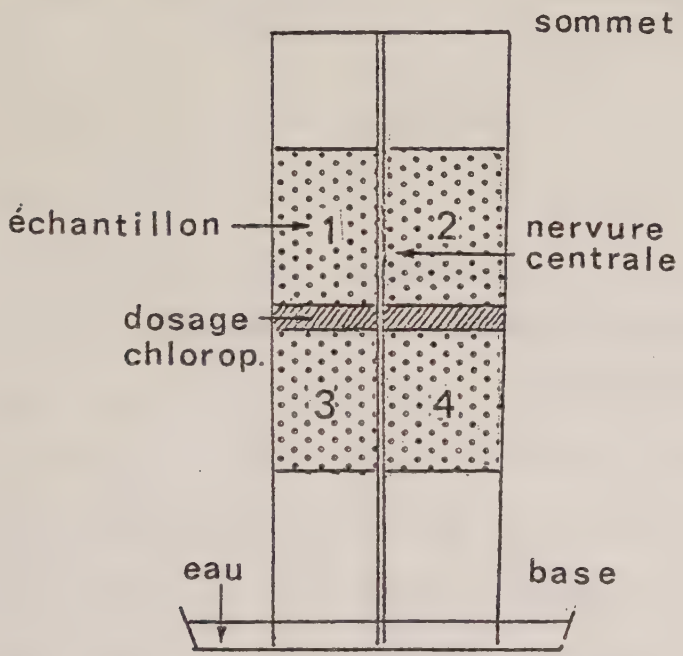


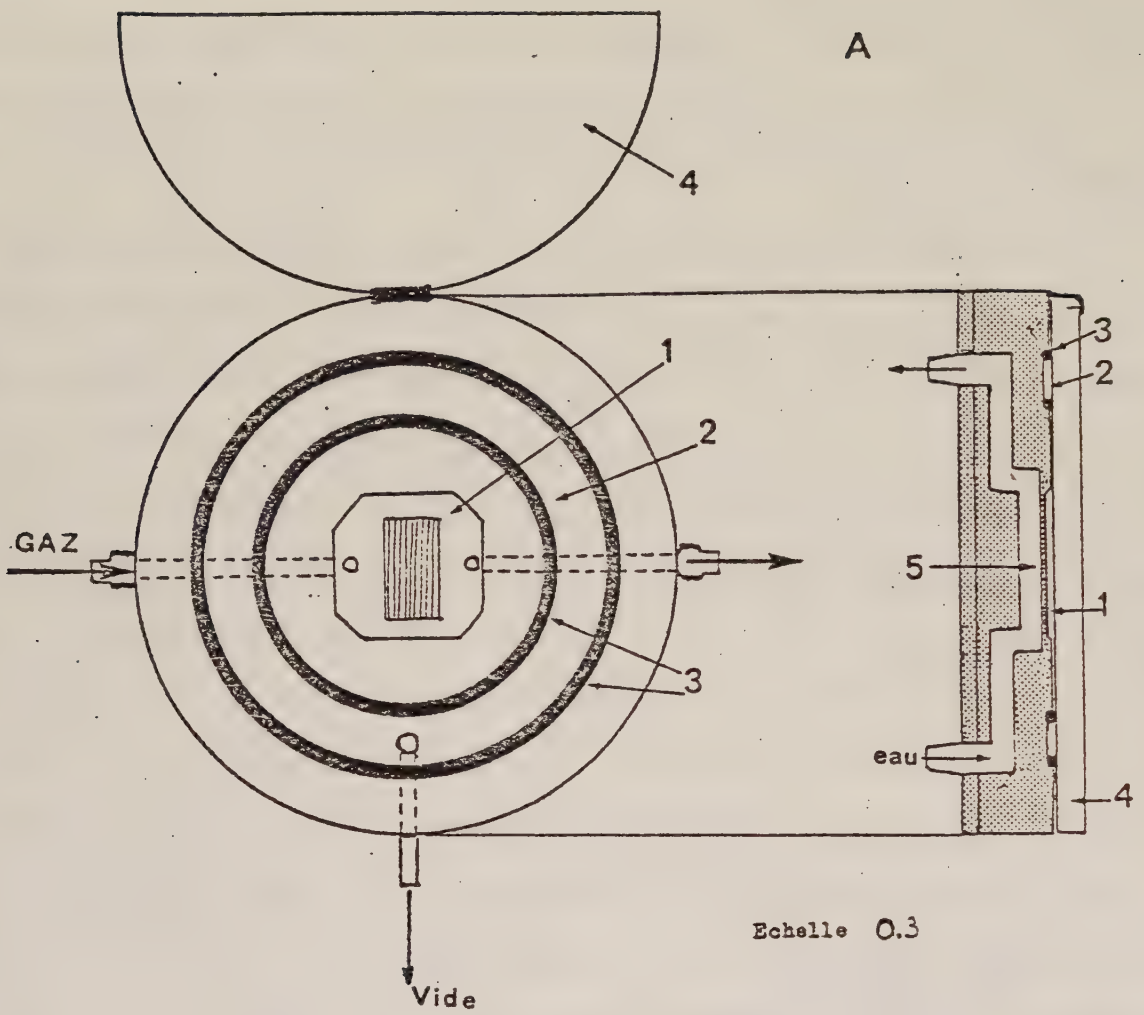

Figure 9

Feuille de maïs. Prélèvement de 4 échantillons pour les expériences à l'équilibre isotopique et de fragments pour le dosage de la chlorophylle.

B. Expérimentation

Le protocole expérimental est exposé en détail au début de chaque chapitre du mémoire ; nous ne donnerons ici que des indications pratiques.

Le (ou les) fragment(s) de limbe sont placés dans une cellule d'expérience A : Fig. 10. Cette cellule a été conçue pour pouvoir




1 chambre d'expérience et échantillon ; 2 dépression annulaire ;
3 joints toriques ; 4 couvercle en plastique transparent ;
5 chambre thermostatée.

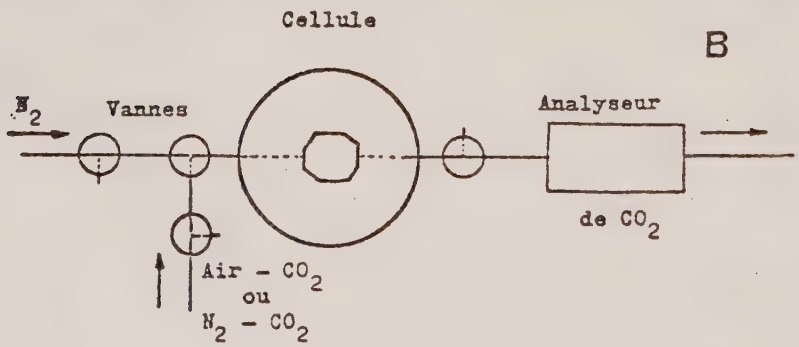



Figure 10

Cellule d'expérience A utilisée pour les expériences à l'équilibre isotopique (A) ; représentation schématique du montage expérimental (B)

changer rapidement l'atmosphère au contact des feuilles et prélever très vite les échantillons en fin d'expérience. La cellule a été façonnée dans un disque de laiton de 18 cm de diamètre et 3 cm d'épaisseur. La chambre d'expérience est une cavité de 0,8 mm d'épaisseur creusée vers l'avant, dans le métal, et fermée par un couvercle en matière plastique transparente de 1 cm d'épaisseur ; ce couvercle est étroitement appliqué sur la cellule en maintenant le vide sur une dépression annulaire creusée autour de la chambre d'expérience et limitée par deux joints toriques en caoutchouc (Fig. 10).

Une circulation d'eau dans une chambre creusée vers l'arrière de la cellule assure une thermostatation à la température de 25°C±1°C.

La chambre d'expérience a un volume de 4 ml ; elle est balayée par un courant gazeux en circuit ouvert (débit de 7-10 l/h). Les gaz sont soit de l'air contenant 0,1% de $CO_2$, soit un mélange d'azote à 0,5% de $CO_2$, ou de l'azote U (Air Liquide) ne contenant que des traces d'oxygène, ou un mélange azote-oxygène (80-20). Les gaz sont saturés en vapeur d'eau par barbotage avant leur introduction dans la cellule. Les mélanges gazeux sont préparés à l'avance et stockés dans des bouteilles métalliques. Un système de vannes électromagnétiques à trois voies monté à l'entrée de la cellule permet de changer rapidement le gaz de balayage : Fig. 10. Compte-tenu du débit gazeux choisi, l'atmosphère de la cellule est complètement renouvelée en 3-5 secondes. On mesure en continu la concentration en $CO_2$ du courant gazeux sortant de la cellule de façon à déterminer la consommation photosynthétique en $CO_2$ à la lumière, au moyen d'un analyseur infrarouge Onera "Le Contrôle de Chauffe". Dans certaines expériences, la teneur en oxygène du gaz est mesurée en continu grâce à une électrode de Clark spéciale balayée par le courant gazeux.

Les feuilles sont éclairées soit en lumière blanche fournie par un arc xénon Osram DWY 650 W, ou en lumière monochromatique de longueur d'onde 650 nm ± 10 nm ; la source de lumière monochromatique est un monochromateur à deux réseaux indépendants alimenté en lumière blanche par un arc xénon Osram XBO 6500 W, construit par M. André sur le modèle du monochromateur solaire à haut-flux du Service de Radio-Agronomie, CEN Cadarache [André, 1966]. Les flux délivrés par l'appareil sont, à 650 nm, de 4-6 $mW.cm^{-2}$ par réseau. Cependant nous n'avons pas rapporté dans le mémoire d'effets de déviation métabolique engendrés par la composition ou la qualité (longueur d'onde) de la lumière. De tels effets, par ailleurs très intéressants, par exemple l'effet du rouge-lointain, ont été décrits dans d'autres publications : voir [Farineau, 1969 ; Michel, 1971 ; Thibault, 1973].

Description de l'électrode à oxygène.

L'appareil est une électrode de Clark classique adaptée à la mesure de la concentration en oxygène dans un mélange gazeux, de débit connu, sortant d'une cellule dans laquelle est placée la feuille en expérience.

Description.

L'appareil, de forme circulaire est représenté en section dans la figure 11, il comprend plusieurs éléments façonnés dans du plexiglass, emboités les uns dans les autres.

Une chambre annulaire (5) est creusée dans le corps de l'appareil (3) ; elle renferme du KCl à demi-saturation dans lequel baignent trois électrodes :

- une électrode de platine (Pt) : disque de platine de 8 mm de diamètre et 0,2 mm d'épaisseur ;
- une électrode annulaire, $AgCl_1$ servant d'électrode de référence (électrode au calomel).

- une électrode annulaire $AgCl_2$.

L'électrode de platine est recouverte par une mince feuille de téflon (épaisseur 0,1 mm).

Un disque de plastique (4) présentant en son centre un orifice de diamètre légèrement supérieur à l'électrode de Pt, ferme la chambre (5) ; de la sorte, un libre passage est assuré pour le KCl entre la chambre (5) et l'électrode de Pt ; le disque (4) sert également de support à la membrane de téflon (le disque est représenté en place dans le schéma de la figure 11).

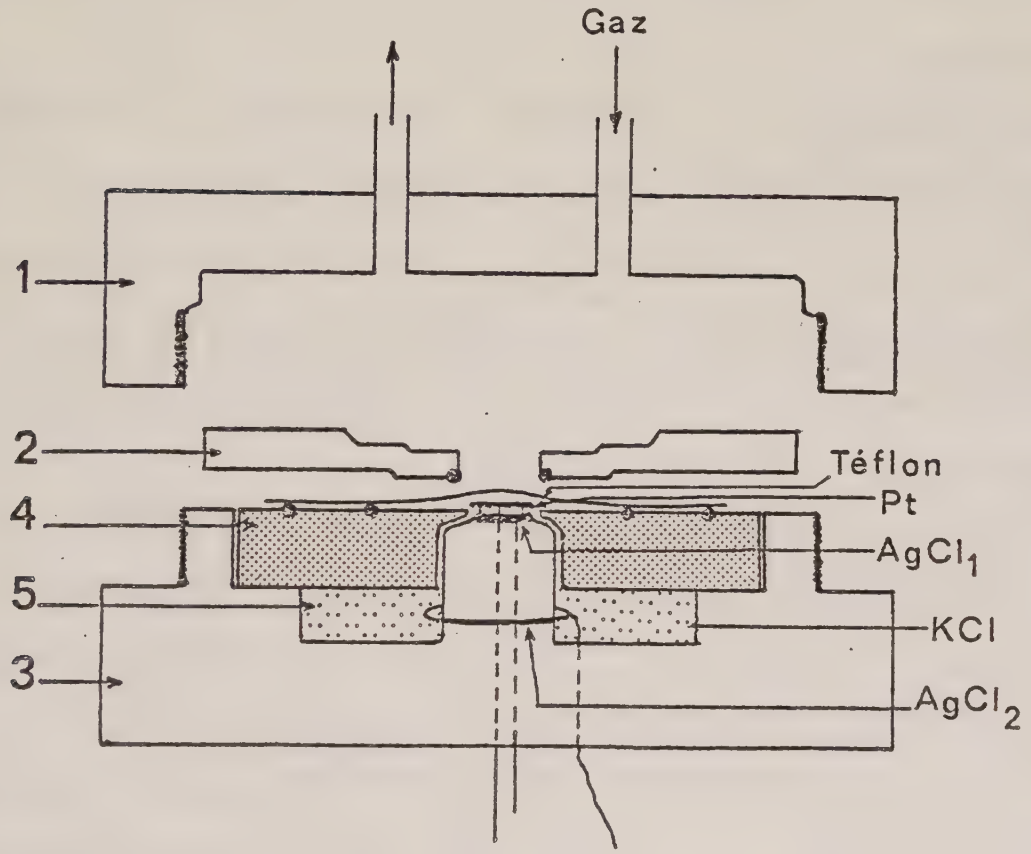



Figure 11

Electrode à oxygène
(Description dans le texte).

La membrane de téflon est étroitement appliquée sur l'électrode de Pt grâce à un deuxième disque annulaire (2) présentant en son centre un orifice de 9 mm de diamètre (le disque (2) est représenté

soulevé sur la figure 11). Le disque (2) repose sur le disque (4) : deux joints toriques en caoutchouc (représentés en section) portés par le disque (4) sont destinés à assurer un contact étroit entre les deux disques et à empêcher la remontée du KCl au-dessus de la membrane de téflon.

Un couvercle (1) vissé sur le corps de l'appareil (5) maintient en place les éléments décrits précédemment.

La chambre d'analyse parcourue par le gaz sortant de la cellule d'expérience, est constituée par la cavité ménagée entre le couvercle (1) et le disque (2) ; le disque (2), grâce à son orifice central met en contact l'électrode de Pt, à travers le téflon, avec la chambre d'analyse.

Fonctionnement.

Une d.d.p. constante d'environ -0,7 V. est maintenue entre l'électrode de Pt et l'électrode $AgCl_1$, au moyen d'un potensiostat Tacussel. D'autre part, l'électrode de Pt et l'électrode $AgCl_2$ sont connectées à un galvanomètre Tacussel muni d'un enregistreur à suiveur de spot Séfram.

L'électrode à oxygène est balayée par un courant d'azote pur (azote U de l'Air Liquide) jusqu'à obtention d'un courant résiduel de valeur constante : environ 200 nano Ampères. L'introduction d'oxygène dans le courant gazeux (100-1000 ppm), entraîne immédiatement une augmentation de l'intensité du courant entre les électrodes Pt et $AgCl_2$ correspondant à la réduction de l'oxygène gazeux ayant traversé le téflon, au niveau de l'électrode de platine.

L'appareil est étalonné avec des mélanges gazeux préparés à partir d'azote U et contenant des teneurs connues en oxygène.

Un fonctionnement correct de l'appareil se traduisant par un bas bruit de fond et une stabilité de la réponse en présence d'un gaz

de teneur déterminée en oxygène, n'est observée que pour de très faibles teneurs en oxygène dans le gaz analysé : dans la pratique 100-500 ppm, mais des mesures sont encore possibles à 1000 ppm. Dans nos expériences où il était par ailleurs préférable de supprimer l'intervention de l'oxygène au niveau métabolique, particulièrement pour l'étude du PGA et des acides C4, la concentration en oxygène des gaz utilisés était voisine de zéro : pour l'étude de la photosynthèse, le gaz choisi était un mélange d'azote U et de 0,5% de $CO_2$. Les concentrations en oxygène photosynthétique dans le courant gazeux sortant de la cellule d'expérience (débit 7-10 l/h) était de l'ordre de 50-100 ppm, et les intensités mesurées de 50-200 nano Ampères.

C. Fixation des échantillons, séparation et dosage des composés.

Les techniques seront décrites plus loin dans une rubrique particulière.

D. Principe du dosage des composés en application de la méthode d'équilibre isotopique.

1. Principe.

Chez les feuilles mises à tremper par la base dans le radiophosphate, la RAS du $^{32}P$ diminue du bas vers le haut, du fait de la lenteur de montée du radioélément dans les vaisseaux. Au niveau de chaque cellule, la variation de RAS du phosphate cellulaire peut être considérée comme très lente au regard de la vitesse d'incorporation du $^{32}P$ dans les composés phosphorylés ; on admet que l'équilibre isotopique est réalisé dans chaque cellule entre les phosphoryles des intermédiaires du CRPP et le phosphate minéral marqué.

L'analyse globale faite sur un échantillon de feuille correspond à la sommation de multiples situations cellulaires particulières, chaque cellule possédant un radiophosphate de RAS stable pendant la

durée de l'expérience, mais inconnu. Pour déterminer les pools de composés en application de la méthode d'équilibre isotopique, il serait possible d'extraire le phosphate minéral d'un échantillon pour en mesurer la RAS ; en fait le phosphate cellulaire existe sous deux formes ; l'une, en renouvellement, participe au métabolisme intermédiaire, cependant que l'autre est immobilisée dans la vacuole [Ullrich et al., 1965] ; on ignore, chez le maïs, tout de la compartimentation cellulaire du phosphate. La RAS du phosphate mesurée par dosage, serait donc estimée par défaut. Pour lever cette difficulté, nous avons choisi comme référence la phosphoglycérate (3 PGA)., dont la RAS peut être connue avec précision ; ce composé présente comme autres avantages d'être stable en solution, d'être abondant dans la cellule (dans la plupart des conditions expérimentales) et de ne pas s'accumuler sous forme non mobilisable puisque 98% du pool cellulaire de ce composé disparaît après quelques minutes de séjour en atmosphère d'azote (Première Partie, Chapitre I). La teneur en un composé X possédant n phosphoryles à l'équilibre isotopique, sera déduite de la teneur en PGA dans l'échantillon (le PGA ayant un seul phosphoryle), par la formule :

$$Q_X \text{ (nanomoles)} = Q_{PGA} \times \frac{\text{Rad X}}{\text{Rad PGA}} \times \frac{1}{n}$$

- $Q_{PGA}$ est déterminée par dosage enzymatique sur un éluat d'une électrophorèse préparative effectuée sur l'échantillon (voir plus loin)
- le rapport Rad X/Rad PGA est déterminé à partir des radioactivités des différents composés marqués de l'échantillon, lesquelles sont mesurées par comptage sur une séparation bidimensionnelle sur papier, réalisée sur une partie aliquote de l'échantillon (voir Méthodes de séparation).

Dans les conditions expérimentales où le PGA est présent en faible quantité, les composés de référence choisis sont soit l'ATP ou l'AMP ; nous avons vérifié que ce dernier composé est à l'équilibre isotopique.

2. Précision de l'évaluation.

Les erreurs commises sur l'estimation de la taille d'un pool de composé X proviennent des erreurs faites sur les mesures de radioactivité de X et du PGA. Les erreurs relatives sur les mesures de radioactivité sont faibles(de l'ordre de 2%) ; en effet les comptages sont répétés 5-15 fois, selon la radioactivité de la tache (1000-5000 ipm) de façon à augmenter la précision du résultat [Galmiche, 1973b, p. 74]. L'erreur sur le dosage est de 3-5% pour des concentrations élevées en PGA dans l'éluat (30-50 nanomoles par ml), mais peut atteindre 20% lorsque la concentration est 8-10 fois plus faible. Dans ce dernier cas, il est préférable d'effectuer un dosage sur un composé plus abondant que le PGA : ATP ou AMP, mais la précision sur le résultat du dosage de ces composés n'est que de 10%.

Compte-tenu de la précision de cette évaluation, il est possible de vérifier la validité de la méthode d'équilibre isotopique. On compare les résultats obtenus par dosage direct d'un composé sur un éluat d'électrophorèse préparative et d'autre part par application de la méthode. Les écarts entre les valeurs sont inférieurs à 20% pour la plupart des composés (les plus stables), ce qui est satisfaisant étant donné que l'incertitude sur les dosages enzymatiques est généralement d'au moins 10%.

Cependant la principale cause d'erreur concerne le manque de reproductibilité des échantillons, qu'ils aient été prélevés sur une même feuille ou sur des feuilles différentes. Nous donnerons un exemple de ce (relatif) manque de reproductibilité dans le Tableau 2 :

la même expérience a été effectuée successivement sur quatre échantillons contigus d'une feuille de maïs. En comparant les valeurs obtenues dans ces quatre expériences, pour le pool de PGA (mesuré par dosage direct) et pour les autres composés, il apparaît que des erreurs systématiques sont commises puisque les résultats de l'expérience 2 sont inférieurs de plus de 10% à la moyenne de l'ensemble des quatre expériences, pour chaque composé étudié (la précision d'une détermination par la méthode d'équilibre isotopique dans les conditions expérimentales choisies : PGA abondant, est de 10%). Pour corriger ces déviations, nous avons considéré comme vraie valeur de la somme ATP, ADP, AMP la valeur moyenne de cette somme pour les quatre expériences ; un facteur correctif est ainsi déterminé permettant de recalculer la valeur de chaque pool d'intermédiaire (le facteur correctif est indiqué dans la dernière colonne du tableau 2).

| Expérience | PGA | DHAP | RuDP | $\sum$ ATP ADP AMP | Correction |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 238<br>(226) | 155<br>(147) | 25<br>(24) | 58 | 55/58 = 0,95 |
| 2 | 188<br>(216) | 120<br>(138) | 22<br>(25) | 49 | 55/49 = 1,15 |
| 3 | 232<br>(209) | 170<br>(153) | 24<br>(22) | 61 | 55/61 = 0,90 |
| 4 | 205<br>(211) | 156<br>(161) | 22<br>(22) | 53 | 55/53 = 1,03 |
| | | | | Moy. : 55.2 | |

Tableau 2 Détermination des pools d'intermédiaires (nanomol.(mg Chl)$^{-1}$) sur 4 fragments contigus prélevés sur une feuille de maïs ; répétition d'une même expérience (photosynthèse stationnaire en atmosphère d'air). Le pool de PGA est déterminé par dosage enzymatique, celui des autres composés en application de la méthode d'équilibre isotopique (voir texte). Les valeurs corrigées indiquées entre parenthèses sont obtenues en multipliant les valeurs trouvées par le facteur correctif dont la valeur est donnée pour chaque expérience dans la dernière colonne.

L'intérêt de cette correction est qu'elle peut être utilisée également dans le cas où les quatre échantillons subissent des traitements très différents ; en effet, la somme ATP + ADP + AMP reste constante, en dehors de l'état stationnaire, la diminution du pool d'ATP (à l'obscurité par exemple), étant compensée par une augmentation des pools d'AMP et d'ADP, aussi bien dans les plastes que dans le cytoplasme [Santarius et Heber, 1965]. Néanmoins cette correction devra être utilisée avec prudence en se limitant à des temps d'expérience de courte durée et pour des traitements peu drastiques : transitions limitées à quelques minutes. Le tableau 3 donne un exemple de correction des valeurs expérimentales dans le cas d'une étude cinétique de l'évolution des pools d'intermédiaires de la feuille, à la lumière et en atmosphère d'azote.

| Expérience | Composés | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Durée du séjour sous azote | PGA | DHAP | RuDP | $\sum$ ATP ADP AMP | Correction |
| 0 | 225 (215) | 130 (123) | 19 (18) | 62 | 59/62 = 0,95 |
| 30 s | 188 (200) | 145 (155) | 20 (21,5) | 55 | 59/55 = 1,07 |
| 60 s | 104 (98) | 188 (177) | 35 (33) | 63 | 59/63 = 0,94 |
| 120 s | 42 (45) | 165 (176) | 62 (66) | 55 | 59/55 = 1,07 |
| | | | | Moy. : 58,8 | |

Tableau 3 Effet d'un séjour sous azote, à la lumière, sur la taille des pools de différents intermédiaires (nanomol.(mg Chl)$^{-1}$). Pour la détermination des pools et des valeurs corrigées, voir tableau 1.

Pour l'établissement d'une cinétique nécessitant 6-10 points expérimentaux il faut rassembler les résultats d'expériences compara-

bles obtenues avec des échantillons prélevés sur des feuilles différentes. Les expériences sont répétées 2-3 fois sur des échantillons provenant de feuilles distinctes ; les valeurs expérimentales obtenues alors en double ou en triple sur des feuilles différentes après correction (comme il est indiqué plus haut) diffèrent généralement de 20% au plus. Ces valeurs sont conservées telles quelles ou bien la moyenne des valeurs est calculée et utilisée comme résultat final.

3. Critique de la méthode d'équilibre isotopique.

a) Avantages.

α) La méthode d'équilibre isotopique est une méthode de dosage commode et précise (environ 10%) pour des composés instables et peu abondants. Les fastidieuses opérations de dosage chimique ou enzymatique sont remplacées par des mesures de radioactivité qui peuvent être automatisées, d'où la facilité et la précision de la mesure. Le PGA, composé dont la concentration doit être connue pour l'application de la méthode est stable en solution (après isolement), abondant et facile à doser.

β) La méthode fournit une analyse d'ensemble - une "empreinte digitale" - des composés phosphorylés impliqués dans le métabolisme intermédiaire (glycolyse et photosynthèse). Ainsi se trouvent clairement mis en lumière des résultats qui auraient pu échapper à une investigation non systématique ; des exemples en sont la mise en évidence d'une forte teneur en DHAP dans les feuilles des végétaux C4, et l'évolution très caractéristique du pool de PEP sous azote, à la lumière ; ces résultats (voir Première Partie) n'ont pas été signalés par d'autres auteurs.

La méthode présente donc déjà un intérêt en tant que méthode d'investigation. En outre il est possible de contrôler les résultats

de dosages obtenus en application de la méthode isotopique en employant des méthodes enzymatiques classiques.

La méthode de correction des valeurs expérimentales qui a été décrite plus haut, est facile à appliquer si on dispose d'un ensemble complet de données de dosage, concernant en particulier les nucléotides ATP, ADP et AMP. La méthode isotopique permet précisément de recueillir un grand nombre de résultats sur un matériel d'expérience.

b) Limitation et difficultés d'application.

Les feuilles coupées supportent parfois très mal un séjour de 24 heures en phytotron sur radiophosphate. Les feuilles adultes ont été préférées aux feuilles jeunes en raison de leur bonne tenue dans ces conditions physiologiques difficiles. On ne conserve pour l'expérimentation que les feuilles présentant un taux de photosynthèse convenable : environ 60 µmoles de $CO_2$ consommé par mg de chlorophylle et par heure sous éclairement de 2-3 $mW.cm^{-2}$ (Lumière blanche), chez le maïs.

La séparation bidimensionnelle sur papier des composés à doser doit être parfaite. Les taches radioactives de PGA, de DHAP ou de PEP sont toujours bien résolues et exemptes d'impuretés radioactives. En revanche, une bonne séparation des sucres diphosphorylés, RuDP et FruDP, est plus difficile à réussir. La tache d'ATP est souvent mal séparée d'un composé de nature inconnue. L'obtention de bonnes séparations exige le dépôt sur la feuille d'électrophorèse d'une faible quantité de matériel : 5 mg environ de poudre lyophilisée ; cependant, la radioactivité présente dans les taches doit être la plus importante possible pour diminuer les erreurs de comptage. En conséquence, la RAS des composés marqués au $^{32}P$ doit être élevée, ce qui nécessite l'emploi de fortes radioactivités dans le milieu d'alimentation des feuilles environ 0,5 mCi/ml.

## III. UTILISATION DES TECHNIQUES DE CHARGE.

Avec les feuilles, la technique de charge a été utilisée pour marquer pendant un temps court les composés photosynthétiques, soit par le $^{14}C$ (utilisation de $^{14}CO_2$ ou de $^{14}C$-bicarbonate), soit par le $^{32}P$-phosphate. L'étude du métabolisme carboné des cellules de gaines isolées a été réalisée aussi grâce à l'emploi de la technique de charge, l'indicateur étant le $^{14}C$ sous forme de bicarbonate. Ces dernières expériences seront décrites en détail dans la deuxième Partie du mémoire ; nous n'aborderons ici que les aspects techniques des expériences de charge réalisées avec des feuilles.

### A. Exposition au $^{14}CO_2$ gazeux.

Les feuilles ont été exposées pendant un temps très court, 6 secondes, au $^{14}CO_2$ selon la technique de Galmiche [1973], reprise sans modifications. Nous renvoyons au travail de cet auteur pour la description du montage expérimental, l'étude théorique sur la composition du nuage radioactif et sur les conditions pratiques de réalisation d'une expérience.

Les feuilles ont été exposées au $^{14}CO_2$ pendant 6 secondes, puis fixées immédiatement par l'azote liquide. Le temps de passage du nuage radioactif sur la feuille est de 3 secondes, compte tenu du débit choisi pour pousser le $^{14}CO_2$ dans la cellule d'expérience, 3 l/mn ; pendant les 3 secondes suivantes, l'atmosphère est très appauvrie en $^{14}C$, ce qui correspond à une chasse de courte durée.

### B. Infiltration de $^{14}C$-bicarbonate dans les feuilles au cours de l'activité photosynthétique.

Les feuilles sont soumises à un type d'expérimentation semblable à celui qui a été décrit pour l'étude des pools d'intermédiaires phosphorylés et acides C4 : exposition à la lumière en atmosphère

d'air ou $N_2$ + $CO_2$ jusqu'à l'installation d'une photosynthèse stationnaire, puis création de perturbations par arrêt de l'alimentation en $CO_2$ ou de l'illumination. En fin d'expérience, le $^{14}C$-bicarbonate est fourni par infiltration.

La cellule d'expérience diffère légèrement de la cellule A précédemment décrite en ce que la chambre d'expérience est plus profonde (5 mm) de façon à pouvoir installer une cuve en matière plastique (9 cm de long, 1 cm de haut, 0,5 cm de profondeur) qui reçoit un volume d'eau de 0,050 ml environ alimentant la feuille en expérience, Fig. 12. Le couvercle en matière plastique de la cellule comporte un orifice fermé par un bouchon en caoutchouc mince (bouchon de flacon stérile) traversé par l'aiguille d'un embout de seringue (l'aiguille a été coudée pour faciliter l'expérimentation).

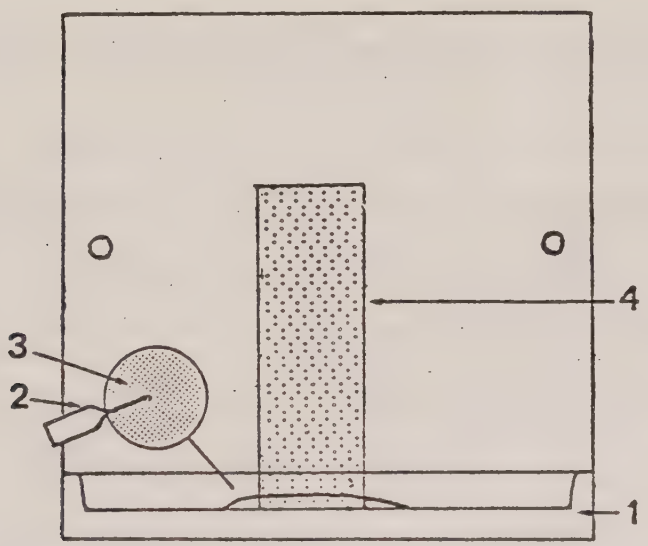



Figure 12

Chambre d'expérience de la cellule B (vue par transparence à travers le couvercle en matière plastique). 1 : augette en matière plastique ; 2 : embout de seringue avec aiguille recourbée ; 3 : orifice du couvercle fermé par un bouchon mince en caoutchouc ; 4 : échantillon de feuille en expérience (échelle x 0.8).

Le radioélément est injecté à la seringue dans la cuve en fin d'expérience et laissé au contact de la feuille pendant un temps court : 10 secondes ; on facilite la montée du radioélément dans les vaisseaux en appliquant le vide pendant 3 secondes sur la chambre d'expérience (1 Torr après 3 secondes) au moyen d'une puissante pompe à palettes ; puis le balayage gazeux est rétabli pour revenir à la pression atmosphérique et pouvoir soulever le couvercle de la cellule ; l'ensemble des opérations comportant la manoeuvre de plusieurs vannes électromagnétiques à 3 voies dure 7-10 secondes. Les feuilles sont ensuite sorties de la cellule et fixées immédiatement par trempage dans l'azote liquide pour analyse. On ne conserve que les fragments de limbe n'ayant pas été au contact direct du radioélément (on écarte la base des feuilles sur une hauteur de 1 cm).

## IV. TECHNIQUES UTILISEES POUR LA FIXATION DES ECHANTILLONS, LA SEPARATION ET LE DOSAGE DES COMPOSES.

### A. Fixation et traitement des échantillons en vue des opérations de séparation.

En fin d'expérience (quelle que soit sa nature), les échantillons subissent les mêmes traitements. Les feuilles sont fixées par trempage dans l'azote liquide, puis broyées dans l'isopentane froid (environ -80°C) au moyen d'un appareil de Potter. L'isopentane est ensuite évaporé sous vide et l'échantillon lyophilisé ; la poudre est réimbibée par 1 ml de formamide anhydre (pour une masse de feuille équivalente à 200 mg de matière fraîche). Les avantages d'une telle technique de fixation à froid des échantillons végétaux par rapport à la fixation par l'alcool bouillant ont été discutés en détail par Galmiche [1973b, p. 82].

B. Séparation des composés.

Deux types de séparation sont effectués sur chaque échantillon végétal lyophilisé puis resuspendu dans la formamide :

- Une séparation préparative portant sur 95-98% environ de l'échantillon : électrophorèse sur papier, permet surtout de recueillir les composés (PGA, autres intermédiaires phosphorylés, acides C4) afin d'évaluer la taille des pools de ces composés dans l'échantillon grâce à des dosages enzymatiques.

- Une séparation analytique portant sur les 2-5% restant permet d'étudier la distribution de radioactivité ($^{14}C$ ou $^{32}P$) dans les différents composés marqués. Il s'agit d'une séparation bidimensionnelle, électrophorèse suivie d'une chromatographie sur papier.

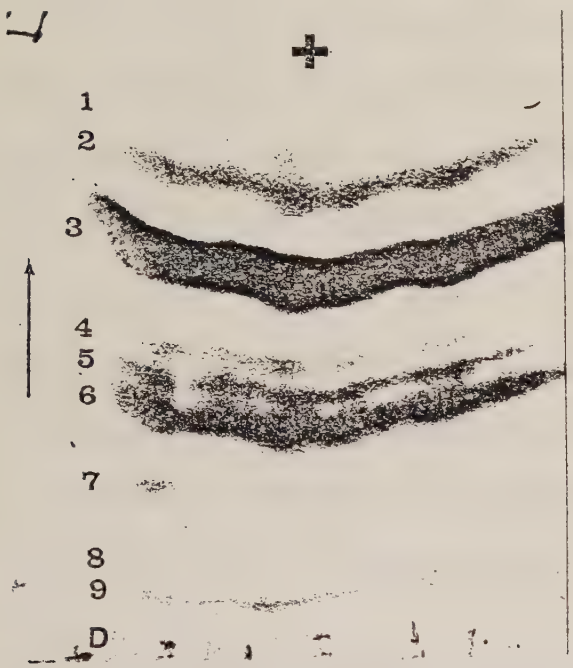
1. Séparation préparative sur papier.

La technique est identique à celle mise au point et utilisée par Galmiche [1963] pour la séparation des composés marqués au $^{14}C$ chez les plantes C3 et C4. La suspension de poudre est déposée sur une ligne de départ correspondant à la largeur d'une feuille de papier Whatmann 3 MM (format 32 x 38 cm) ; la feuille est imprégnée d'un tampon volatil pH 4,5 (pyridine 45 ml, acide acétique 62,5 ml, eau 4900 ml et versène sel de sodium 325 mg). Une différence de potentiel de 1500 volts est appliquée entre les extrémités de la feuille pendant 75 minutes (champ de 50 $V.cm^{-1}$, courant de 60 mA) ; la température de la feuille est maintenue à 0°C environ par réfrigération. Après la séparation, la feuille de papier est séchée dans un courant d'air chaud (25°C), puis les composés radioactifs sont repérés par radiographie au moyen d'un film Kodirex (Kodak). Un exemple de résultat est présenté dans la figure 13 ; plusieurs bandes radioactives sont mises en évidence, chacune renferme un ensemble de composés qui ont été identi

fiés de façon précise à partir des résultats fournis par la séparation bidimensionnelle.

Figure 13

Séparation préparative des composés phosphorylés marqués par le $^{32}P$




Autoradiographie. Electrophorèse haute-tension sur papier en tampon volatil (voir texte)
+ représente l'anode, D le départ.
1) PEP ; 2) 3 PGA, 2 PGA et traces ; 3) phosphate minéral, oses diphosphorylés, glycérate et malate (non marqués) ; 4) DHAP ; 5) UDPG, traces ; 6) oses monophosphorylés, ATP et ADP, traces (l'aspartate migre dans les bandes 5 et 6) ; 8) AMP, 7 et 9) non identifiés.

Les composés d'une bande sont élués à l'eau (une nuit à 4°C).

2. Séparation analytique des composés marqués au $^{32}P$ ou au $^{14}C$.

Nous avons mis au point en 1966 [Farineau, 1966] une technique de séparation sur papier de l'ensemble des composés photosynthétiques consistant à faire, dans un premier temps, une électrophorèse haute-tension pH 4,5, puis après séchage de la feuille, une chromatographie descendante dans la direction perpendiculaire. Le mode opératoire est le suivant :

- électrophorèse 20 µl de suspension sont déposés sur une feuille de papier Whatmann 3 MM imprégnée de tampon pH 4,5 (voir ci-dessus). La séparation est conduite de la même façon que pour l'électrophorèse préparative.
- chromatographie On coud une feuille de papier Whatmann n° 4 sur le côté de la feuille d'électrophorèse (voir schémas de la Fig. 14) ;

cette feuille Whatmann n° 4 sera mise à tremper dans le solvant de chromatographie ; ce papier a été choisi car il assure une migration lente des solvants et des composés.

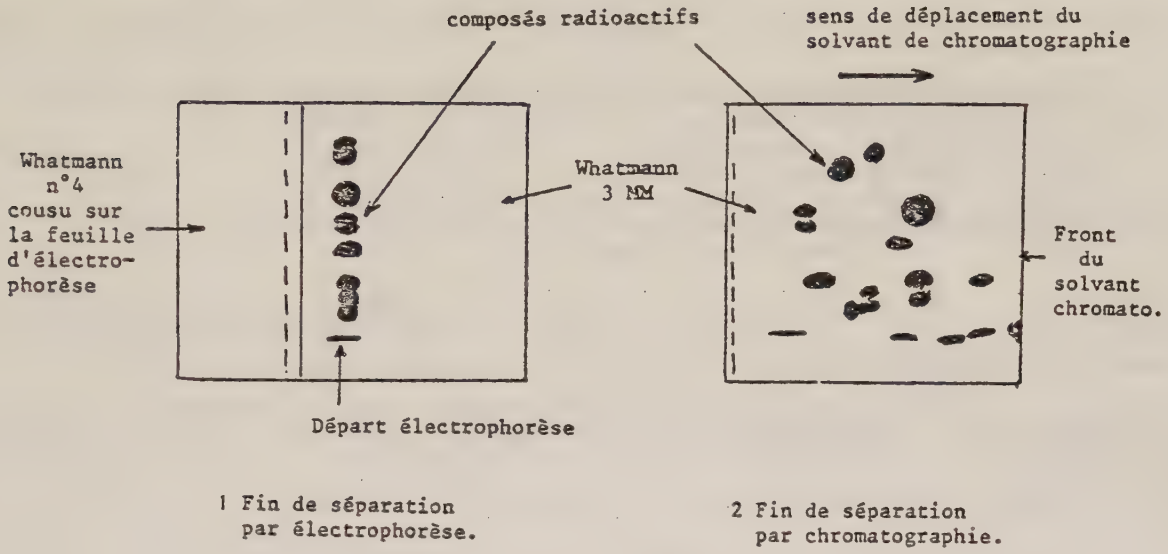
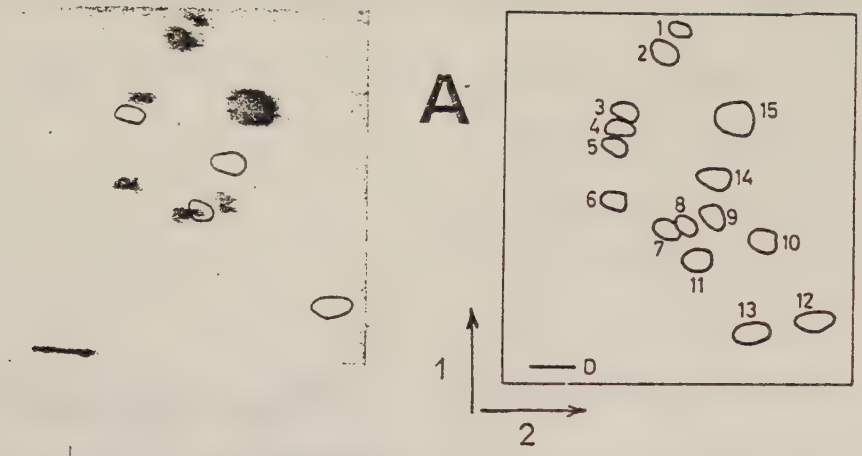



Figure 14

Réalisation d'une séparation bidimensionnelle sur papier.

Composition du solvant : acide isobutyrique 100 ml, ammoniaque N 60 ml, versène sel de sodium 30 mg [Tyszkiewicz, 1962]. Ce solvant a été choisi car il permet d'obtenir une bonne séparation des nucléotides (ATP, ADP, AMP) et des différentes catégories d'oses phosphorylés : ainsi, dans la bande 6 (voir figure 13), les oses phosphorylés qui migrent peu, sont bien séparés de l'ATP et de l'ADP : fig. 15.

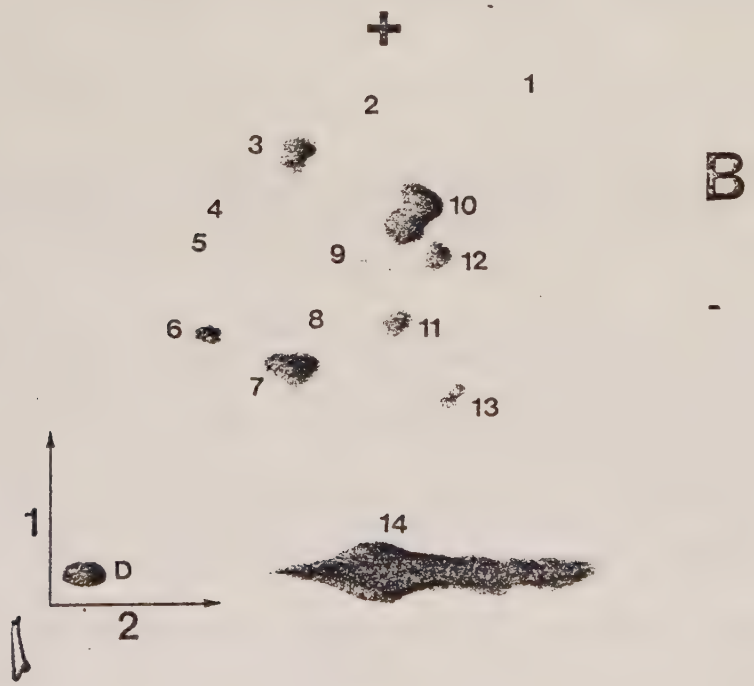
Les acides C4 : malate et aspartate (marqués au $^{14}C$ : fig. 15), sont très mobiles dans ce même solvant et bien séparés des différents intermédiaires du cycle de Calvin.




Séparation bidimensionnelle sur papier des composés phosphorylés marqués au $^{32}P$. Autoradiographie et interprétation. Papier Whatmann 3 MM. *1* Electrophorèse — solvant pyridine, acide acétique, eau ; *2* Chromatographie — acide isobutyrique, ammoniaque N, eau . (*1*) PEP; (*2*) PGA; (*3*) Ru1-5$P_2$; (*4*) Fru1-6$P_2$; (*5*) Sed1-7$P_2$; (*6*) UDPG; (*7*) $G_6P$; (*8*) Fru 6P; (*9*) ATP; (*10*) ADP; (*11*) Saccharose P; (*12*) AMP; (*13*) X ?; (*14*) DHAP; (*15*) Phosphate minéral; *D* départ

A Marquage par le $^{32}P$ : feuille de maïs à l'équilibre isotopique, en photosynthèse sous air.

B Marquage par le $^{14}C$ : feuille de maïs fixée après 10 minutes de photosynthèse en atmosphère d'air + $^{14}CO_2$.




B - 1 : pyruvate ; 2 : PEP ; 3 : 2 et 3 PGA ; 4 : RuDP ; 5 : FruDP ; 6 ; UDPG ; 7 : G6P + Sed7P + Fru6P ; 8 : pentoses P ; 9 : DHAP ; 10 : malate ; 11 : aspartate ; 12 : glycérate ; 13 : glutamate ; 14 : saccharose ; D : départ ; 1 : direction électrophorèse ; 2 : chromatographie ; + anode (électrophorèse)

Figure 15

Séparation bidimensionnelle sur papier des composés photosynthétiques

Cette méthode de séparation alliant l'électrophorèse et la chromatographie a été préférée à la séparation classique par chromatographie bidimensionnelle car, d'une part, elle est plus rapide (l'électrophorèse durant 1 heure), d'autre part, elle permet en général de réaliser une bonne séparation des sucres diphosphorylés (composés d'importance toute particulière pour notre étude); RuDP et FruDP sont entraînés loin du départ dans la séparation par électrophorèse, alors que par chromatographie, leur migration est très réduite avec les solvants habituels.

Les composés radioactifs sont repérés par autoradiographie.

Identification des composés.

Les composés marqués au $^{14}C$ ont été identifiés d'après Galmiche [1963, 1973b]. Nous avons essentiellement contrôlé l'identification et la pureté radiochimique des composés marqués au $^{32}P$ ou au $^{14}C$ dans notre matériel.

On contrôle de façon simple l'identification d'un composé en ajoutant à la suspension de poudre analysée, des composés non radioactifs du commerce (produits Sigma si possible) ; on vérifie la coïncidence exacte de la tache radioactive avec le produit "froid" révélé par une réaction colorée (les intermédiaires phosphorylés sont repérés par pulvérisation du réactif de Hans et Ischerwood : acide perchlorique 60%, 5 ml; acide chlorhydrique N, 10 ml; molybdate d'ammonium 4% (P/V), 2,5 ml; eau 60 ml).

On s'assure de la pureté radiochimique d'un composé d'une tache radioactive en effectuant une transformation enzymatique sur les composés d'un éluat de la tache, puis une séparation pour identifier les produits formés et mettre en évidence d'éventuelles impuretés radioactives. Ce contrôle est essentiel pour l'application de la méthode d'équilibre isotopique.

- Le PGA est réduit en trioses phosphate puis glycérol phosphate par le NADH en présence de 3 phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase, 3 PGA kinase, triose isomérase (TIM), α glycérophosphate déshydrogénase (α GDH). La technique opératoire est décrite en détail dans le livre de Bergmeyer [1962, page 224]. Le glycérol phosphate a été identifié par ses caractéristiques chromatographiques [Tyszkiewicz, 1962].

La méthode précédente permet de mettre en évidence le 3 PGA ; la tache PGA renferme également du 2 PGA révélé par sa transformation en 3 PGA par action de la 3 PGA mutase en présence de 2-3 PGA [Bergmeyer, 1962, p. 224]. La transformation enzymatique est alors totale : aucune contamination radioactive n'est mise en évidence dans la tache PGA.

- le DHAP est transformé en glycérol phosphate par le NADH en présence de TIM et αGDH [Bergmeyer, 1962, p. 26] ; pas d'impureté décelée.

- Le FruDP est transformé en glycérol phosphate par le NADH en présence d'aldolase, TIM, αGDH [Bergmeyer, 1962, p. 246] ; pas d'impureté décelée.

- Le RuDP est transformé en PGA par carboxylation en présence de RuDP carboxylase (préparée selon Weissbach et al. [1956]) ; une impureté décelée représentant 10-20% du RuDP lorsque ce composé est peu abondant dans les feuilles,et négligeable dans le cas contraire).

- L'ATP-$^{32}$P est combiné au glucose, en présence d'hexokinase, avec formation d'ADP-$^{32}$P et de glucose 6P-$^{32}$P (ce dernier composé renferme le phosphoryle terminal de l'ATP) : [Bergmeyer, 1962, p. 117]. Les produits formés sont séparés par électrophorèse-chromatographie (voir plus haut) pour identification. La méthode permet de vérifier, que à l'équilibre isotopique Rad ADP-$^{32}$P = 2 x Rad G6P, les 3 phosphoryles de l'ATP devant avoir la même radioactivité spécifique. L'ATP est

souvent mal séparé d'une impureté radioactive qui représente 20-30% de la radioactivité de l'ATP-$^{32}$P.

- L'ADP-$^{32}$P est transformé en ATP par le système PEP-pyruvate kinase [Bergmeyer, 1962, p. 229], puis identification des produits comme ci-dessus ; pas d'impureté décelée.

- L'AMP-$^{32}$P est successivement transformé en ADP par l'adénylate kinase en présence d'un excès d'ATP puis l'ADP en ATP par phosphorylation en présence de PEP-pyruvate kinase [Bergmeyer, 1962, p. 573] ; pas d'impureté décelée.

- Le PEP-$^{32}$P est transformé en pyruvate et ATP-$^{32}$P en présence d'ADP et pyruvate kinase [Bergmeyer, 1962, p. 229] ; pas d'impureté décelée.

Mesure des radioactivités sur papier.

Les taches radioactives sont découpées. Dans le cas d'un marquage par le $^{32}$P, la radioactivité est mesurée directement au moyen d'un compteur à bas bruit de fond (3-5 ipm) Tracerlab AC2 équipé d'une fenêtre ultra-fine (150 $\mu g.cm^{-2}$) ; un passeur automatique d'échantillon permet de répéter (au moins 10 fois) les comptages individuels. La radioactivité, dans le cas de taches renfermant des composés marqués par le $^{14}$C, est mesurée par une méthode classique de scintillation liquide, utilisant le mélange scintillant PPO-POPOP en solution dans le toluène.

C. Dosages enzymatiques.

Ils ont été effectués sur des éluats de bandes d'électrophorèse préparatives, par application de techniques enzymatiques. Seuls les échantillons à l'équilibre isotopique ont été utilisés, aucun dosage n'a été effectué sur du matériel marqué par le $^{14}$C.

Le PGA a été dosé pour l'application de la méthode d'équilibre isotopique ; la concentration en PGA (3 PGA et 2 PGA) dans l'éluat de la bande 2 de l'électrophorèse préparative faite sur chaque échantillon (figure 13), est déterminée par la méthode de Czok et al. [livre de Bergmeyer, 1962, p. 224] ; le 3 PGA est réduit en trioses phosphate par le NADH en présence d'ATP, de 3 phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase et 3 PGA kinase (produits Boehringer) ; on suit l'oxydation à 340 nm du NADH avec un spectrophotomètre Cary 16 ; les réactions sont menées à 20°C avec des cuves de 1 ml et 1 cm de trajet optique. Le 2 PGA, représentant 5-8% du 3 PGA, est mesuré après dosage du 3 PGA en ajoutant du 2-3 PGA et de la 3 PGA mutase (produits Sigma), voir [Bergmeyer, 1962, p. 224].

L'ATP a été dosé selon une modification de la méthode de Strehler [1953], en mesurant l'émission lumineuse de la réaction luciférine-luciférase, en présence d'ATP, au moyen d'un appareil permettant l'étude des réactions enzymatiques par une méthode d'écoulement (appareil "stopped-flow" Durrum).

L'AMP est dosé selon la technique de H. Adam [Bergmeyer, 1962, p. 573]. Le malate et l'aspartate ont été dosés par des techniques enzymatiques décrites également dans [Bergmeyer, 1962].

Le malate est dosé dans un éluat de la bande 3 de l'électrophorèse préparative en suivant la réduction du NAD en NADH à 340 nm en présence de malate déshydrogénase (Sigma) et de sulfate d'hydrazine pour piéger l'oxaloacétate formé [Bergmeyer, 1962, p. 328].

L'aspartate est dosé dans un éluat des bandes 5 et 6 en suivant l'oxydation du NADH à 340 nm, en présence de malate déshydrogénase, aspartate aminotransférase (Sigma) et 2-oxoglutarate [Bergmeyer, 1962, p. 381].

# RESULTATS EXPERIMENTAUX

## PREMIERE PARTIE

## ETUDES METABOLIQUES DE LA FEUILLE DE MAIS

Nous nous proposons, dans la première partie du mémoire, d'étudier, chez la feuille de maïs, les deux processus métaboliques caractéristiques de la photosynthèse C4 : la voie de synthèse des acides C4 et le cycle réductif des pentoses phosphate (CRPP) ou cycle de Calvin. Un premier chapitre a été consacré exclusivement à la mise en évidence du déroulement du cycle de Calvin chez le maïs ; dans le second chapitre, nous nous sommes efforcé de préciser le rôle joué par les acides C4 dans le fonctionnement de la photosynthèse C4, chez ce même matériel.

### I. MISE EN EVIDENCE D'UN DEROULEMENT NORMAL DU CYCLE DE CALVIN CHEZ LES FEUILLES DE MAIS EN PHOTOSYNTHESE.

Dans le chapitre I sont rapportées des expériences ayant eu pour but de démontrer le déroulement du cycle de Calvin chez le maïs. Deux étapes du CRPP ont été particulièrement étudiées - a) la réaction de carboxylation aboutissant à la synthèse de PGA, b) l'étape de réduction du PGA en trioses phosphate. Nous avons également abordé le problème de l'intervention de l'oxygène dans le métabolisme des intermédiaires du CRPP.

Pour mener à bien cette étude, nous avons utilisé la "méthode des pools" (voir Méthodes). Les pools de composés phosphorylés ont été déterminés chez des feuilles à l'équilibre isotopique avec le $^{32}P$.

Amenées initialement à un état de photosynthèse stationnaire en atmosphère d'air ou de $N_2$ + $CO_2$, les feuilles ont été soumises ensuite à divers traitements provoquant de manière spécifique des perturbations du fonctionnement du cycle de Calvin ; il en résulte des modifications des tailles des compartiments des intermédiaires du cycle, qui retentissent sur les tailles des pools cellulaires des mêmes composés : rappelons que les pools de la plupart des composés du CRPP sont hétérogènes puisqu'un même composé (PGA ou DHAP etc ...) participe au déroulement de la glycolyse et du CRPP dans deux espaces distincts : cytoplasme et plastes respectivement.

Le CRPP a été schématisé dans la figure 16 sous la forme d'une séquence de trois réactions (ou groupe de réactions) : 1) carboxylation de l'accepteur de $CO_2$ ; 2) réduction du PGA en trioses phosphate ; 3) régénération de l'accepteur à partir des trioses phosphate.

Pour l'étude du déroulement de la réaction de carboxylation, la perturbation choisie a consisté à supprimer le $CO_2$ de l'atmosphère, ainsi d'ailleurs que l'oxygène (perturbation α, exp. A, figure 16) : les feuilles ont été balayées par un courant d'azote pur, sous éclairement. Le but de l'expérience est de caractériser l'accepteur de $CO_2$, lequel doit s'accumuler sous azote. Nous avons supposé, que cet accepteur est inconnu, conformément à nos hypothèses de travail initiales, émises à une époque où l'intervention d'une transcarboxylase en photosynthèse était envisagée [Hatch et Slack, 1970]. Notre objectif est donc d'apporter des éléments d'interprétation soit en faveur de la transcarboxylase : quelle est alors la nature de l'accepteur de $CO_2$ ? ou en faveur de l'intervention de la RuDPC - peut-on caractériser le RuDP dans les feuilles, et ce composé a-t-il les propriétés d'un accepteur de $CO_2$ ?

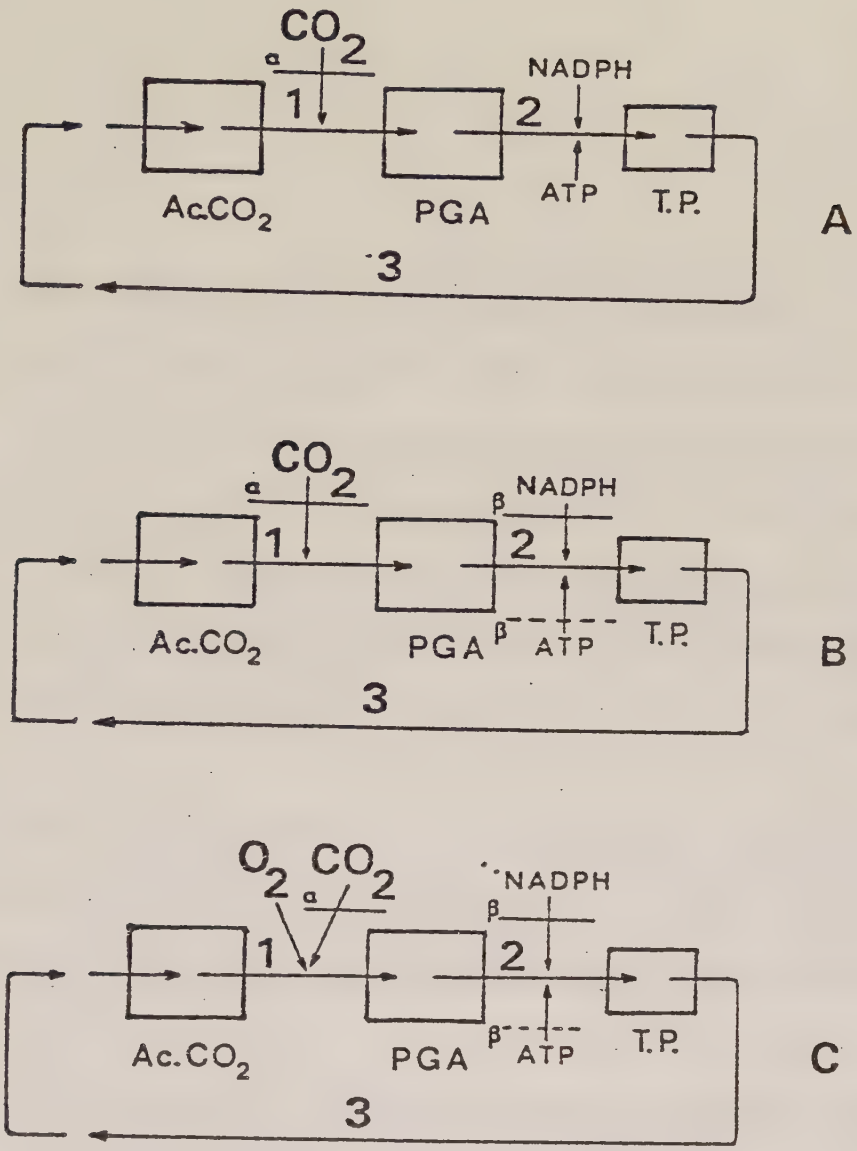



Figure 16

Expériences destinées à étudier le déroulement de certaines étapes du cycle de Calvin, et l'intervention de l'oxygène en photosynthèse. Voir texte.

$Ac.CO_2$ : accepteur de $CO_2$ ; T.P. : trioses phosphate. Perturbations : $\alpha$ : privation de $CO_2$ ; $\beta$ : action de la CMU : diminution des synthèses de NADPH et d'ATP.

Pour l'étude de la réaction de réduction du PGA en trioses phosphate, ex. B fig. 16, un inhibiteur spécifique du PS II, la CMU a été utilisé, afin de diminuer fortement (ou totalement) l'activité réductrice des plastes : perturbation β, réaction 2. - nous discuterons par la suite l'action sur CMU sur la genèse d'ATP par photophosphorylation. Les pools de composés ont été mesurés chez la feuille ainsi traitée après un séjour prolongé (12 minutes) sous azote et à la lumière.

L'effet de l'oxygène sur la synthèse des intermédiaires du CRPP (certains intermédiaires seulement) a été étudié dans l'expérience C, qui est une variante de l'expérience B ; on a substitué un mélange $N_2$-$O_2$ (80-20, v/v) à l'azote pur. On a fait figurer sur le schéma de la figure 16, exp. C, un site possible d'intervention de l'oxygène, au niveau de la réaction de carboxylation (réaction 1).

L'étude du déroulement du cycle de Calvin est conduite à partir d'une comparaison entre une plante C3, Phragmites et le maïs (plante C4). Notre objectif a également été de déceler d'éventuelles caractéristiques métaboliques propres au déroulement du cycle de Calvin chez la plante C4 étudiée.

L'étude est présentée à partir d'extraits de deux publications : Farineau, 1969 (publication n°1) et Farineau, 1971 (publication n° 2).

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des feuilles adultes de maïs et Phragmites communis ont été utilisées dans les divers types d'expériences.

## Détermination des réservoirs de quelques composés phosphorylés dans les feuilles de maïs et Phragmites.

Publication n° 1

### 1. Expériences

Les feuilles subissent successivement trois traitements:

*a)* Des feuilles de Maïs sont placées pendant 24 h dans une enceinte thermostatée à 25° C (phytotron), sous éclairement de 2000 lux; elles reçoivent par infiltration un indicateur nucléaire du métabolisme du phosphate sous forme de $H_3{}^{32}PO_4$ (200microcuries/ml) de concentration négligeable, additionné à un milieu de Knop sans phosphate.

*b)* Des fragments de limbe (200 à 300 mg de poids frais) sont prélevés, pesés, traités ou non par la CMU, puis placés en boîtes de Pétri dans le phytotron sous éclairement de 2000 lux, pendant 30 à 40 mn: c'est une phase de conditionnement destinée à placer la feuille dans des conditions de photosynthèse stationnaire, avant l'expérience.

Dans le cas d'un traitement par la CMU, les limbes sont frottés sur les deux faces avec un coton imbibé d'une solution éthanol-eau (v,v) de CMU $10^{-3}$ M. Des échantillons témoins sont traités dans les mêmes conditions par la solution éthanolique sans CMU; aucun effet sur la photosynthèse, ni sur les teneurs en composés phosphorylés n'est observé dans ces conditions.

*c)* Les feuilles sont alors soumises à l'une des expériences décrites ci-après,

(voir aussi les légendes des tableaux et figures)

Les feuilles sont fixées sur une plaque métallique, puis placées dans une cellule de laiton étanche présentant une face transparente en plexiglass, thermostatée à 25° C; l'atmosphère gazeuse est renouvelée par un balayage permanent d'un gaz saturé d'eau: air + 1000 ppm de $CO_2$, $N_2 + O_2$ (80—20) ou $N_2$ purifié ($O_2$ inférieur à 5 ppm). Les échanges de gaz carbonique de la feuille sont mesurés au moyen d'un analyseur infra-rouge de type Onera, alimenté par le gaz de balayage. L'éclairement en lumière blanche est assuré par une lampe Sylvania, type DWY, de 650 W:

. Lors d'un traitement par la CMU, l'expérience est conduite en deux temps:

— *8 mn* en atmosphère air + 1000 ppm de $CO_2$, pendant lesquelles mesure d'abord, pendant 3—4 mn, l'intensité respiratoire à l'obscurité, puis la consommation photosynthétique de $CO_2$ sous un éclairement de 13000 lux. On calcule le pourcentage d'inhibition de la photosynthèse en comparant la consommation chez les feuilles traitées par la CMU à celle des témoins.

— *12 mn* en atmosphère d'$N_2$ ou $N_2 + O_2$.

### 2. Séparations et dosages (voir METHODES ET TECHNIQUES)

En fin d'expérience, les feuilles sont rapidement prélevées, plongées dans l'azote liquide, broyées dans l'isopentane en fusion (— 100° C) avec un appareil de Potter, puis lyophilisées; 1 ml de formamide anhydre est ajoutée à la poudre pour extraire les composés phosphorylés. Une partie aliquote de l'extrait est prélevée pour une séparation bidimensionnelle sur papier des composés phosphorylés et détermination de leurs radioactivités respectives Farineau (1966). La radioactivité des composés est mesurée sur papier au moyen d'un compteur à circulation gazeuse et à bas bruit de fond. Une séparation «préparative» des intermédiaires phosphorylés est faite sur le reste de l'extrait par électrophorèse sur papier selon Galmiche (1963) .; le PGA, et éventuellement, l'ATP sont recueillis par élution et dosés au moyen de techniques spécifiques: dosage enzymatique du PGA selon Czok et al. (1962), dosage de l'ATP par la réaction lumineuse, luciférine-luciférase d'après Strehler (1953).

Les teneurs sont exprimées en nanomoles par mg de poids frais ou, en prenant pour référence la chlorophylle, en nanomoles par mg de chlorophylle.

Les teneurs des feuilles en différents composés phosphorylés sont calculées d'après le relation suivante (on sait que, à l'équilibre isotopique, tous les composés ont la même radioactivité spécifique):

$$C_X = C_{PGA} \times \frac{\text{Rad. X}}{\text{Rad. PGA}} \times \frac{1}{n}$$

où $C_X$ et $C_{PGA}$ représentent les teneurs des feuilles en composés X et PGA (exprimées en nanomoles/mg de chl.).

Rad. X et Rad. PGA, les radioactivités respectives de X et du PGA mesurées sur le chromatogramme (Fig. 15).

$n$, le nombre d'atomes de phosphore du composé X.

Nous avons vérifié que tous les atomes de phosphore de l'ATP, ADP, et Ru1-5P, isolés au cours d'une même expérience, ont une radioactivité spécifique identique. Les déterminations de teneur par dosage direct et par la méthode d'équilibre isotopique ne diffèrent que de 10% en moyenne.

Les expériences rapportées dans la publication n° 2 ont été réalisées d'une façon semblable. Cependant les feuilles furent exposées à un éclairement monochromatique : 650 nm ± 10 nm, 50 000 ergs.cm$^{-2}$.s$^{-1}$, en atmosphère d'air + 0,5% $CO_2$ ; après l'installation d'un état de photosynthèse stationnaire (5-7 minutes), on a substitué au mélange gazeux précédent, un mélange $N_2$ + 0,5% $CO_2$ pendant 5 minutes ; les feuilles ont été balayées ensuite par un courant d'azote pur.

RESULTATS

1. Mesure des réservoirs de quelques intermédiaires phosphorylés en photosynthèse chez le maïs et Phragmites.

Les pools d'intermédiaires phosphorylés de la photosynthèse ont été mesurés chez la plante C4 (le maïs) et la plante C3 (Phragmites) par la méthode d'équilibre isotopique (voir Méthodes). A notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été présentée chez de telles plantes ; nous insisterons donc sur les résultats qu'elle fournit. En photosynthèse stationnaire, le 3PGA s'accumule dans les feuilles de maïs et de Phragmites : voir tableau 4, photosynthèse sous air normal et éclairement d'intensité moyenne.

Chez les feuilles de maïs en photosynthèse, les réservoirs de DHAP et de FruDP ont une taille beaucoup plus importante que chez les plantes C3. Cette accumulation est surtout observée aux forts éclairements

auxquels correspondent des intensités photosynthétiques élevées ; ainsi le pool de DHAP est environ deux fois plus important à 80 000 lux qu'à 13 000 lux (exp. I et II, tableau 5, en atmosphère d'air enrichi en $CO_2$ : 1°/oo) et quatre fois plus élevé à 80 000 lux (exp. I, tableau 5) qu'à 2000 lux et sous air normal (exp. A, tableau 6). On notera que parallèlement à l'augmentation des pools de DHAP et FruDP, une accumulation de RuDP est également observable (comparer tableaux 5 et 6).

Tableau 4 Mesure des réservoirs de quatre intermédiaires du cycle de Calvin, en photosynthèse, chez une feuille de plante C4 (le maïs) et C3 (Phragmites) à l'équilibre isotopique. Les feuilles ont été fixées pour analyse après une période de photosynthèse stationnaire de 5 minutes sous air (300 ppm de $CO_2$) et éclairement de lumière blanche d'intensité moyenne (10 000 lux) ; consommation de $CO_2$, en µmol.(mg Chlorophylle)$^{-1}$.h$^{-1}$ : 60 chez le maïs et 40 chez Phragmites. Réservoirs : nanomol.mg Chlorophylle$^{-1}$.

| Composés | Maïs | Phragmites communis |
|---|---|---|
| PGA | 210 | 95 |
| DHAP | 75 | 7 |
| RuDP | 13 | 5 |
| FruDP | 9 | 2 |

Tableau 5 *Mesure des réservoirs de 3 composés phosphorylés chez les feuilles de maïs en photosynthèse stationnaire (équilibre isotopique)*

Les fragments de feuilles sont sortis du phytotron et transférés rapidement dans la cellule d'expérience où ils sont soumis à un balayage de 12 mn par un courant d'air humide (1 000 ppm de $CO_2$), sous éclairement de 80 000 lux : expérience I (saturation lumineuse) ou 13 000 lux : expérience II. Une consommation constante de $CO_2$ correspondant à la photosynthèse stationnaire est observée au bout de 6—9 mn : expérience I : 197 µM/mg Chl/heure ; expérience II : 98 µM/mg Chl/heure (sous éclairement de 13 000 lux, la consommation de $CO_2$ en photosynthèse stationnaire est moitié de celle de la saturation lumineuse).

| Conditions | Composés n moles . mg Chl.$^{-1}$ | | |
|---|---|---|---|
| | PGA | DHAP | Ru 1-5$P_2$ |
| 80 000 lux (Exp. I) | 245 | 195 | 23 |
| 13 000 lux (Exp. II) | 206 | 119 | 14 |

2. Effet de la privation de $CO_2$ à la lumière sur la taille des réservoirs de quelques composés phosphorylés chez le maïs et Phragmites.

a) Etude préliminaire : effet d'un court séjour sous azote sur l'évolution de l'ensemble des composés phosphorylés de la feuille de maïs en photosynthèse (publication n° 1). Les résultats sont présentés dans le tableau 6. Seuls quatre intermédiaires du CRPP voient leur teneur modifiée sensiblement, ce qui a justifié leur choix pour une étude du métabolisme carboné photosynthétique après perturbation de la photosynthèse stationnaire. Aucun composé phosphorylé stable de nature inconnue ne s'accumule sous azote. On note aussi que le pool de PEP, accepteur présumé de $CO_2$ pour la voie de synthèse des acides C4 est nettement plus petit sous azote.

Tableau 6 *Evolution des réservoirs de quelques composés phosphorylés à la suite d'un bref séjour en atmosphère d'azote*

*Expérience A*: Fragments de feuille en photosynthèse stationnaire dans le phytotron sous air (300 ppm de $CO_2$), 25° C, éclairement de 2000 lux (tubes Mazda-fluor Lumière du Jour).

*Expérience B*: Fragments de feuilles sortis du phytotron, et rapidement transferrés dans la cellule d'expérience où ils sont soumis à un balayage de 3 mn par un courant de $N_2$ pur, humide; éclairement de 13000 lux (Lampe Osram DWY). Détermination des réservoirs par application de la méthode d'équilibre isotopique.

| Conditions | Composés — n moles . mg Chl$^{-1}$ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | PGA | DHAP | Ru 1,5 $P_2$ | ATP | ADP | AMP |
| A 2000 lux Air (phytotron) | 185 | 45 | 11 | 47 | 12 | 5 |
| B—3 mn $N_2$ | 34 | 141 | 61 | 57 | 8 | 2,5 |
| | PEP | Fru 1-6 $P_2$ | G6P | Fru6P | UDPG | $PO_4$ minéral |
| A 2000 lux Air (phytotron) | 49,5 | 11 | 110 | 61 | 57 | 3320 |
| B-3 mn $N_2$ | 9 | 33 | 105 | 58 | 52 | 3880 |

b) Etude cinétique comparée : variation des pools de quatre intermédiaires au cours d'une transition $N_2 + CO_2/N_2$, à la lumière (Maïs, Phragmites) (publication n° 2).

PROTOCOLE Les feuilles sont éclairées en atmosphère d'air + 0,5% de $CO_2$ jusqu'à l'installation d'une photosynthèse stationnaire; on substitue ensuite un mélange $N_2$ + 0,5% $CO_2$ au mélange gazeux précédent. L'état de photosynthèse stationnaire est conservé avec maintien d'une consommation égale en $CO_2$. Par ailleurs nous n'avons pas décelé d'effets de la privation d'oxygène, pendant une courte période : 5 minutes, en photosynthèse stationnaire, sur la teneur des feuilles en intermédiaires phosphorylés et acides C4 ; ainsi il est possible de comparer les expériences rapportées dans les publications 1 et 2.

Le choix d'un mélange $N_2$-$CO_2$ (99,5-0,5, v/v) en photosynthèse, présente de nombreux avantages sur un plan technique. Il est préférable de partir d'un mélange dépourvu d'oxygène, si l'on veut étudier ensuite l'émission d'oxygène en atmosphère sans $CO_2$ et en anaérobiose (c'est-à-dire sous azote). Ainsi il n'est pas nécessaire, préalablement au balayage par l'azote pur, de faire le vide sur le circuit gazeux pour le débarrasser de l'oxygène qu'il renferme. D'autre part, on ne peut mesurer l'émission d'oxygène photosynthétique, avec notre électrode, qu'en atmosphère très pauvre en oxygène.

Après installation de la photosynthèse stationnaire sous $N_2$ + $CO_2$, les feuilles sont balayées par un courant d'azote, ce qui correspond à une transition photosynthèse stationnaire ($N_2$ + $CO_2$)/ séjour sous $N_2$, à la lumière.

RESULTATS

When $CO_2$ was removed during illumination the changes in RuDP and 3-PGA pools were similar in leaves of corn and *Phragmites (Figure 17a.b)*. The RuDP pool (carbon acceptor) rose rapidly and that of 3-PGA declined sharply.

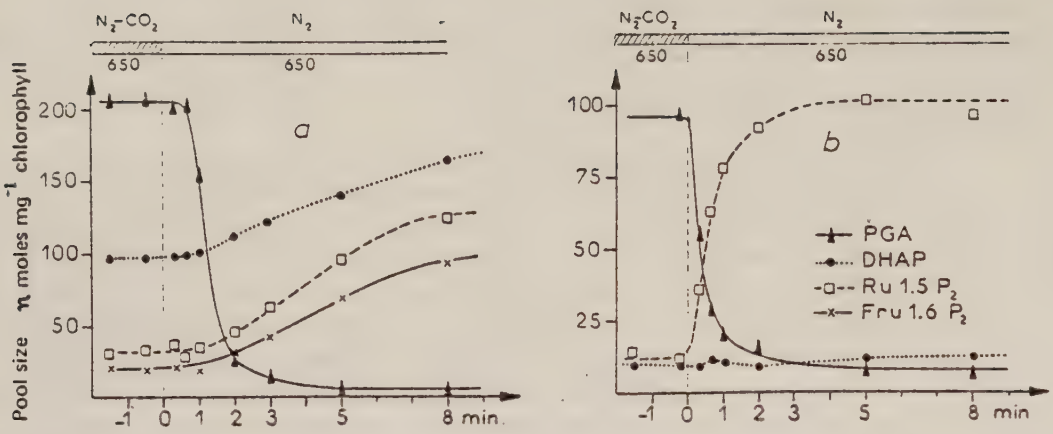



*Figure 17 Changes in pool sizes of some phosphorylated intermediates of the Calvin cycle in the light following removal of $CO_2$. (a) corn (b) Phragmites*

However there are also several important differences between species in the behavior of these phosphorylated Calvin cycle intermediates. Firstly, in *Phragmites* the changes are immediate, whereas in corn, changes in the pool size of 3-PGA, RuDP, dihydroxyacetone phosphate (DHAP), and fructose-1,6-diphosphate (FDP) are only seen 30-50 seconds after removal of $CO_2$.

Secondly, the pool sizes of DHAP and FDP are large in corn leaves, compared to *Phragmites (Figure 17)*, but still rise after removal of $CO_2$ and decrease again only after 10-15 min in $CO_2$ free $N_2$.

c) Effets d'un séjour prolongé (12-30 minutes) en atmosphère d'azote, à la lumière (maïs) (extraits de la publication n° 1).

Comme le montre l'analyse rapportée dans le tableau 7 : voir Exp. III, les feuilles de maïs accumulent sous azote le ribulose diphosphate, à une teneur de 80-90 nanomol.(mg Chlorophylle)$^{-1}$, soit une valeur voisine de celle observée chez Phragmites dans les mêmes conditions (Figure 17). Le pool de DHAP a nettement décru (comparer avec l'exp. II et la figure 17) mais reste important ; enfin le pool de PGA est devenu extrêmement petit : environ 5 nanomol.(mg Chl.)$^{-1}$.

A la suite d'un séjour très prolongé sous azote, à la lumière (20-30 minutes) la teneur en DHAP devient très faible (10-20 nanomol. (mg Chl)$^{-1}$) ; le pool de RuDP continue à augmenter jusqu'à atteindre 100-140 nanomol.(mg Chl)$^{-1}$.

Tableau 7. *Mesure des réservoirs de 3 composés phosphorylés dans des conditions d'inhibition de la photosynthèse, à la lumière (équilibre isotopique)*

On distingue deux types de conditions expérimentales:

Expèriences III et VI : Les fragments de feuilles sont sortis du phytotron, rapidement transférés dans la cellule d'expérience, amenés à l'état de photosynthèse stationnaire sous air-$CO_2$(1 °/₀₀), puis balayés pendant 12 minutes par de l'azote pur ou par un mélange $N_2$-$O_2$(80-20, v/v) et fixés.

Expériences IV, V, VII : Les fragments de feuilles sont soumis à un traitement par la CMU (voir Méthodes), puis exposés 20 mn dans le phytotron sous éclairement de 2000 lux. Ils sont alors transférés dans la cellule d'expérience et soumis dans chaque cas à un balayage de 8 mn par un courant d'Air (1000 ppm de $CO_2$) pour mesurer le degré d'inhibition de la photosynthèse, sous éclairement de 13000 lux (voir Méthodes).

Ensuite, selon les expériences, un balayage de 12 mn est assuré par $N_2$: expériences IV, V ou $N_2$—$O_2$ (80—20, v/v): expérience VII

Eclairement de lumière blanche: 13 000 lux (environ 3 mW.cm$^{-2}$).

| Conditions | Composés nmol.(mg Chl)$^{-1}$ | | |
|---|---|---|---|
| | PGA | DHAP | RuDP |
| Air + 1000 ppm $CO_2$ (exp. II) | 206 | 119 | 23 |
| $N_2$ (exp. III) | 6 | 63 | 87 |
| $N_2$ inhibition CMU 95% (exp. IV) | 43 | 22 | 21 |
| $N_2$ inhibition CMU 100% | 30 | 6 | 3 |
| $N_2$-$O_2$ (exp. VI) | 40 | 15 | 8 |
| $N_2$-$O_2$ inhibition CMU 95% (exp. VII) | 134 | 11 | 3 |

## 3. Action de la CMU chez les feuilles de maïs illuminées sous azote.

Le traitement des feuilles par la CMU, un inhibiteur spécifique du photosystème II, a permis de conjuguer deux types de perturbations : l'inhibition de la fourniture de NADPH et la privation de $CO_2$ en anaérobiose.

L'action de la CMU a été étudiée dans les expériences IV et V (voir Tableau 7 et aussi la figure 18). On observe chez les plantes traitées par la CMU une accumulation de PGA et une diminution des te-

neurs en DHAP et RuDP (exp. IV, inhibition non totale de la photosynthèse). Cependant, dans le cas d'une inhibition totale de la photosynthèse : exp. V, les teneurs des feuilles en DHAP et RuDP sont très basses, et la concentration en PGA beaucoup plus faible.

4. Effet de l'oxygène en atmosphère privée de $CO_2$, chez le maïs, à la lumière.

Les composés phosphorylés ont été analysés chez des feuilles soumises à un séjour prolongé en atmosphère $N_2$-$O_2$ (80-20), et éventuellement à un traitement par la CMU. La teneur des feuilles en PGA est beaucoup plus élevée en aérobiose que sous azote, quel que soit le degré d'inhibition du pouvoir réducteur : Exp. VI et VII, comparées aux expériences III et IV respectivement (Tableau 7) et figure 18. On observe également une diminution remarquable de la taille du pool de RuDP en aérobiose (comparer les expériences III et VI, tableau 7).

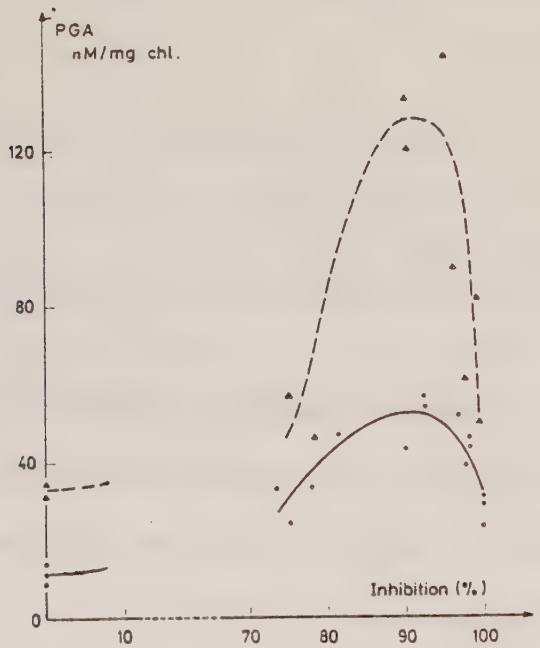



Fig. 18 Evolution du réservoir de PGA en fonction du degré d'inhibition du pouvoir réducteur par la CMU. Eclairement de 13000 lux, atmosphère de $N_2$: — o — o — ou $N_2$—$O_2$: — — ▲ — — ▲ — —. Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites au Tableau 7 pour les expériences d'illumination en lumière blanche avec traitement par la CMU, et atmosphère de $N_2$ ou $N_2$—$O_2$. La teneur en CMU de la solution alcoolique ayant servi à frotter les feuilles varie de 0 à 0,2 M, ce qui permet d'observer des variations du pourcentage d'inhibition de la photosynthèse de 0 à 100 %

L'effet de l'oxygène pourrait être de favoriser la production de PGA en permettant le déroulement des activités respiratoires. Aussi avons-nous mesuré les pools des composés phosphorylés chez les feuilles placées à l'obscurité soit en aérobiose, soit sous azote pur (tableau 8). En aérobiose et à l'obscurité, le pool de PGA bien que nettement plus important qu'en anaérobiose et obscurité, est 3-5 fois plus petit qu'en photosynthèse stationnaire (comparer les tableaux 8 et 7).

Tableau 8 *Mesure des réservoirs de 3 composés phosphorylés chez des feuilles à l'obscurité (équilibre isotopique)* Maïs

Les fragments de feuilles, à leur sortie du phytotron sont transférés dans la cellule d'expérience et soumis à 12 mn d'un balayage par un courant de $N_2$—$O_2$ (80—20, v/v): les feuilles sont alors en respiration active (expérience IX), ou $N_2$: expérience X, la respiration est supprimée

| Conditions | Composés (nanomoles . mg Chl$^{-1}$) | | |
|---|---|---|---|
| | PGA | DHAP | Ru 1-5 $P_2$ |
| $N_2$—$O_2$ (80—20) (Exp. IX) | 45 | 4 | 2 |
| $N_2$ (Exp. X) | 10 | 7 | 2 |

DISCUSSION - CONCLUSIONS.

Grâce à l'utilisation d'une méthode particulière d'étude des composés du cycle de Calvin : la mesure de la taille des pools de composés phosphorylés en photosynthèse et leur variation à la suite d'une perturbation de l'état stationnaire, nous avons entrepris de démontrer le déroulement complet du cycle de Calvin en photosynthèse chez une espèce C4.

a) Etude de la réaction de carboxylation du cycle de Calvin chez le maïs.

α) L'effet de la privation de $CO_2$, à la lumière, doit être d'accumuler l'accepteur de $CO_2$ et de diminuer la teneur en PGA, substrat de la réaction (réaction 1, figure 16). On observe chez le maïs et Phragmites , une accumulation de RuDP, une diminution considérable

du pool du PGA ; chez le maïs, en outre, les pools de DHAP et FruDP augmentent transitoirement puis décroissent lentement. L'effet de la privation de $CO_2$ chez les plantes C4 et C3 peut s'expliquer de façon simple en admettant une perturbation de la réaction de carboxylation du cycle de Calvin catalysée par la RuDPC. Le PGA serait synthétisé par fixation de $CO_2$ sur le RuDP, ce composé fonctionnant comme accepteur de $CO_2$ : réaction 1 catalysée par la RuDPC, figure 16 ; on ne met d'ailleurs pas en doute le fonctionnement de cette enzyme chez les plantes C3 [Galmiche, 1973a,b]. Les activités de photoréduction ne devraient pas être inhibées sous azote ; la réaction de réduction du PGA en trioses phosphate (réaction 2, fig. 16) et celles qui assurent la régénération du RuDP (réaction 3) se dérouleraient à des vitesses normales. En conséquence l'accepteur de $CO_2$, le RuDP, est régénéré et s'accumule car sa consommation est ralentie en atmosphère sans $CO_2$ (il faut en effet envisager la possibilité d'une fourniture de $CO_2$ par le métabolisme cellulaire). Chez l'espèce C4, l'accumulation de RuDP entraînerait celle des composés participant à la voie de synthèse de ce composé ; ce résultat expérimental reste à expliquer (voir paragraphe c). La teneur en PGA reste basse car la vitesse de synthèse de ce composé par photosynthèse ou glycolyse est très faible et égale à sa vitesse de consommation par diverses réactions : réduction en trioses phosphate, synthèses d'acides aminés etc...

L'observation d'une évolution antiparallèle des pools de PGA et de RuDP sous azote, c'est-à-dire en atmosphère privée de $CO_2$, sans être une preuve indiscutable du fonctionnement de la RuDPC chez le maïs, est néanmoins une indication très sérieuse en faveur de l'hypothèse de l'intervention de l'enzyme en photosynthèse. Wilson et Calvin [1955] ont interprété de façon semblable un résultat iden-

tique obtenu chez les algues. Nous avions avancé l'hypothèse de l'intervention de la RuDPC chez une plante C4, le maïs, en 1968 [Farineau, 1969], à une époque où les activités RuDPC mises en évidence dans les feuilles étaient si faibles qu'un déroulement normal de la réaction de carboxylation du cycle semblait exclu. La découverte de fortes activités RuDP chez différentes plantes C4 [Bjorkman et Gauhl, 1969] a permi de lever une critique majeure pouvant être adressée à notre interprétation.

Laber et al. [1974] ont également observé une accumulation de RuDP chez les feuilles de jeunes plantules de maïs (4-6 jours) illuminées en atmosphère privée de $CO_2$ ($N_2$ + 1,5% $O_2$). Après avoir fourni du $^{14}CO_2$ à de telles feuilles enrichies en RuDP, les auteurs ont observé une chute du pool de RuDP et une formation de PGA-$^{14}C$. Ce résultat peut être considéré comme une preuve du fonctionnement de la RuDPC in vivo chez le maïs.

Nous n'excluons pas absolument une autre interprétation des résultats concernant l'évolution des pools de RuDP et PGA sous azote, chez le maïs, faisant appel à l'intervention d'une transcarboxylase. Cette enzyme pourrait transférer directement le $CO_2$ du carboxyle 4 d'un acide C4 sur un accepteur hypothétique à 2 ou 5 carbones [Hatch et Slack, 1970]. Nous avons déja signalé qu'on ne dispose pas à l'heure actuelle de preuves convaincantes de l'existence d'une telle enzyme, bien qu'un auteur [Pan, 1975, thèse de Doctorat] affirme avoir isolé une transcarboxylase chez le maïs. Le substrat d'une telle enzyme, en tout état de cause, devrait être le RuDP au vu de nos résultats expérimentaux. Une transcarboxylase peut effectivement exister mais n'avoir qu'un rôle secondaire.

β) Nous insisterons pour finir sur un deuxième point très important. L'étude cinétique de l'évolution des pools de PGA et RuDP a permis de mettre en évidence une différence intéressante entre plantes C4 et C3 : chez le maïs, la privation de $CO_2$ n'a pas de répercussion immédiate sur la taille des pools de PGA et de RuDP qui restent constantes pendant 30-40 secondes sous $N_2$. La feuille semble pouvoir utiliser pendant cette période une importante réserve cellulaire de $CO_2$. Nous analysons en détail cette question dans le paragraphe II, au sujet du rôle des acides C4 en photosynthèse chez le maïs.

b) Réduction du PGA en trioses phosphate et régénération du RuDP.

La mise en évidence de l'étape réductrice du cycle a été entreprise en faisant agir la CMU, un inhibiteur spécifique du photosystème II.

Considérons d'abord le cas où l'inhibition de la photosynthèse n'est pas totale (exp. IV, tableau 7). Le traitement par la CMU appliqué à des feuilles illuminées sous azote, provoque chez celles-ci (par rapport au témoin non traité) une accumulation de PGA, et une diminution des pools de DHAP et RuDP ; ces derniers composés dérivant du PGA par déroulement des réactions 2 et 3 du cycle de Calvin (figure 16), les résultats observés sont tout à fait en accord avec l'hypothèse selon laquelle l'inhibition s'exercerait au niveau de la réaction 2 du cycle. La CMU, inhibiteur spécifique du PS II réduit à la fois la fourniture en NADPH, synthétisé grâce aux transferts non cycliques d'électrons, et en ATP dont la génèse est couplée à ces mêmes transferts non cycliques. Cependant il est vraisemblable que de l'ATP pourrait encore être produit par photophosphorylation cylique [Simonis et Urbach, 1973]. Ainsi on peut envisager que seul le fonctionnement de la glycéraldéhyde phosphate déshydrogé-

nase serait gravement perturbé ; les réactions kinasiques, et en particulier celle qui conduit à la synthèse de RuDP par phosphorylation de Ru5P, doivent continuer à se dérouler ; le PGA peut être synthétisé par fixation de $CO_2$ sur le RuDP, le $CO_2$ provenant d'une activité métabolique, par exemple la fermentation.

Dans le cas où l'inhibition de la photosynthèse à la suite d'un traitement par la CMU est totale (exp. V, tableau 7), le fonctionnement du CRPP est totalement perturbé par suite d'un déficit grave en ATP (et NADPH). La teneur des feuilles en composés phosphorylés est alors peu différente de celle de la feuille à l'obscurité, sous azote (exp. X, tableau 8) laquelle ne présente pratiquement plus aucune activité métabolique.

c) Importance des pools de DHAP et FruDP chez le maïs.

Le DHAP et le FruDP s'accumulent dans les tissus des feuilles de maïs lorsque l'activité photosynthétique est intense (tableaux 4, 5 et 6). On observe également lors d'une transition photosynthèse/séjour sous $N_2$, à la lumière, une augmentation transitoire des pools de DHAP et FruDP (figure 17), puis une diminution très lente des pools de ces deux composés en prolongeant le séjour sous azote ; dans ces dernières conditions expérimentales, on observe parallèlement une augmentation continuelle du pool de RuDP. Ce dernier résultat (concernant le RuDP) a été confirmé par Laber et al. [1974] dans une étude semblable à la nôtre effectuée sur le maïs. Il semble clair que l'accumulation du DHAP et du FruDP soit à relier à la régénération du RuDP, les deux premiers composés étant les précurseurs du dernier. D'autre part dans les conditions où est observé le phénomène d'accumulation du DHAP et du FruDP : atmosphère dépourvue de $CO_2$, forts éclairements, le $CO_2$ doit être le facteur limitant de l'évolution de la photosynthèse, ce qui

doit contribuer à l'augmentation relative du pool de l'accepteur de $CO_2$ (le RuDP) par moindre consommation.

Généralités du phénomène d'accumulation de DHAP et FruDP chez les plantes C4.

Nous avons pu observer ce phénomène chez d'autres plantes C4 et uniquement chez elles. Il représenterait donc une caractéristique du déroulement du cycle de Calvin propre à ces végétaux - la seule que nous ayons réussi à mettre en évidence par une étude globale de la photosynthèse de la feuille. Ainsi avons-nous observé l'accumulation de DHAP et FruDP chez les Atriplex C4 (spongiosa, rosea), mais non chez Atriplex hastata (C3) (résultats non publiés). Des observations semblables ont été faites chez les Amarantus C4 de la flore de la région parisienne, chez des Panicum C4 (bulbosum, texanum, miliaceum) (résultats non publiés).

Nous proposerons une interprétation de ce phénomène s'appuyant sur la constatation suivante : le DHAP et le FruDP sont des composés synthétisés dans les plastes qui diffusent rapidement hors des organites [Heber et al., 1967 ; Bassham et al., 1968] ; ainsi les plastes isolés d'épinard photoassimilent le $CO_2$ en rejetant une fraction importante du DHAP (et FruDP) formés, dans le milieu d'incubation des organites où la transformation de ces composés en autres intermédiaires est évidemment impossible. D'une manière analogue, chez les feuilles de plantes C4, le DHAP et le FruDP synthétisés dans les plastes pourraient s'accumuler dans un espace de volume important (relativement à celui des plastes) où les possibilités de transformation métabolique sont limitées.

Notons cependant que, lorsque les cellules isolées de feuilles d'épinard (plante C3) sont en photosynthèse active, en milieu hypertonique, le marquage du DHAP par le $^{14}C$ est très inférieur à celui du PGA (Annexe). Il paraît clair que le DHAP ayant migré dans le cyto-

plasme est transformé en PGA par le jeu des trioses phosphate deshydrogénases cytoplasmiques ou bien utilisé par d'autres voies de synthèse, celle des sucres ,par exemple [Heber, 1974].

Chez les plantes C4, et particulièrement chez le maïs, le DHAP et le FruDP pourraient être synthétisés aussi bien dans les plastes de la gaine que dans ceux du mésophylle, selon les interprétations 1 et 2 (figures 1 à 4) ; on est conduit également à supposer un transfert de ces composés entre les deux catégories de cellules. La régénération du RuDP à partir du DHAP (ou du FruDP) serait impossible dans les plastes de mésophylle. Si l'on admet aussi que le DHAP et le FruDP ne peuvent être transformés activement dans le cytoplasme du mésophylle les composés devraient s'accumuler dans ces cellules.

d) Oxygène et teneur des feuilles en PGA et RuDP.

Les feuilles de maïs éclairées en atmosphère d'air dépourvu de $CO_2$ ($N_2$-$O_2$, 80-20 v/v) ont une teneur en PGA beaucoup plus élevée que les feuilles témoins illuminées sous azote (tableau 7). Le PGA formé en aérobiose pourrait avoir diverses origines. Le composé pourrait provenir au moins pour partie, du déroulement d'une activité de glycolyse-respiration, laquelle, à l'obscurité, donne naissance à une formation notable de PGA (tableau 9). Cependant on constate un fait remarquable : l'augmentation du pool de PGA est accompagnée d'une diminution de celui du RuDP. Une interprétation de ces derniers résultats serait de considérer que le PGA formé en aérobiose à la lumière puisse provenir de la carboxylation du RuDP, par le $CO_2$ provenant de la photorespiration. Ce processus métabolique n'est observable qu'en

atmosphère renfermant une forte teneur en oxygène (20% au moins) et une faible concentration en $CO_2$ (50-300 ppm), et exige de fortes intensités lumineuses [Tolbert 1971]. Ces conditions sont réunies dans les expériences réalisées en aérobioses décrites plus haut (tableau 7, fig. 17).

Enfin si l'on admet le fonctionnement de la RuDP oxygénase, — enzyme clef de la photorespiration selon Tolbert et al. [1974] ; Lorimer et al. [1973], du PGA pourrait être formé par dismutation oxydative du RuDP (réaction 1, exp. C, figure 16). Selon Bahr et Jensen [1974] le rapport des activités carboxylase et oxygénase chez la RuDPC extraite du maïs serait de 4,1 ; l'importance de cette activité permet d'envisager in vivo une origine presque exclusive du glycolate à partir du RuDP via le phosphoglycolate. Ainsi on peut expliquer simplement par le jeu de l'oxygénase en milieu gazeux oxygéné dépourvu de $CO_2$, à la fois l'accumulation (relative) de PGA et l'appauvrissement en RuDP des feuilles.

## Chapitre II

## ROLE DES ACIDES C4 DANS LE DEROULEMENT DE LA PHOTOSYNTHESE CHEZ LE MAIS.

D'après Hatch [1971b], le $CO_2$ fixé par la RuDP carboxylase pendant l'activité photosynthétique C4 proviendrait exclusivement de la décarboxylation des acides C4. Cette proposition concernant le rôle physiologique des acides C4 a été soumise à une vérification expérimentale. Nous avons d'abord essayé de montrer que les acides C4 des feuilles pouvaient représenter une réserve de $CO_2$ utilisable pour le déroulement de la photosynthèse en atmosphère dépourvue de $CO_2$, par exemple chez les feuilles soumises à une transition photosynthèse stationnaire/séjour en atmosphère d'azote, à la lumière (atmosphère dépourvue de $CO_2$, et en anaérobiose). Cette étude fait l'objet de la Première Partie A de ce chapitre.

D'autre part nous avons voulu déterminer l'importance exacte du rôle joué par les acides C4 dans le déroulement du cycle de Calvin. Ces acides jouent-ils un rôle d'intermédiaire obligatoire entre le $CO_2$ atmosphérique et les composés du cycle de Calvin [Hatch, 1971b] ? ou bien n'ont-ils qu'un rôle secondaire en photosynthèse en ne fixant qu'une fraction du $CO_2$ atmosphérique, le reste étant incorporé directement (sans passer par le pool cellulaire d'acides C4) selon la voie C3. L'étude est rapportée dans la deuxième partie B du chapitre.

## A. LA DECARBOXYLATION DES ACIDES C4 REPRESENTE UNE SOURCE DE $CO_2$ UTILISEE POUR LE DEROULEMENT DE L'ACTIVITE DU CYCLE DE CALVIN CHEZ LES FEUILLES DE MAIS.

Deux manifestations de la photosynthèse ont été étudiées chez des feuilles illuminées sous azote : le dégagement d'oxygène et la synthèse des intermédiaires du cycle de Calvin, cependant que a été suivie en parallèle l'évolution des pools d'acides C4.

### 1. Etude du dégagement d'oxygène chez des feuilles de maïs illuminées en atmosphère d'azote.

Protocole expérimental. Les fragments de feuilles de maïs et Phragmites (250 mg environ) sont illuminés dans la cellule d'expérience A. La teneur en oxygène du courant gazeux ($N_2$-$CO_2$ ou $N_2$) sortant de la cellule est mesurée en continu au moyen de l'électrode de Clark (voir Méthodes). Le gaz utilisé pour atteindre l'état de photosynthèse stationnaire est dépourvu d'oxygène : $N_2$ + 0,5% de $CO_2$. Les feuilles sont placées dans des conditions identiques au début de l'expérience (débit du gaz de balayage 10 l/h, intensité d'illumination par une lumière monochromatique 650 nm : 4 $mW.cm^{-2}$ environ) puis l'intensité lumineuse est ajustée pour obtenir une vitesse de dégagement d'oxygène égales chez le maïs et Phragmites. Ensuite, on substitue un courant d'azote (débit 10 l/h) au mélange $N_2$-$CO_2$.

Résultats : Dans la figure 19 est présentée l'évolution de la vitesse d'émission d'oxygène au cours d'une transition $N_2$ + $CO_2/N_2$, à la lumière, chez le maïs et chez Phragmites. La courbe d'émission d'oxygène à la lumière est représentée en traits pleins ; la courbe en tireté

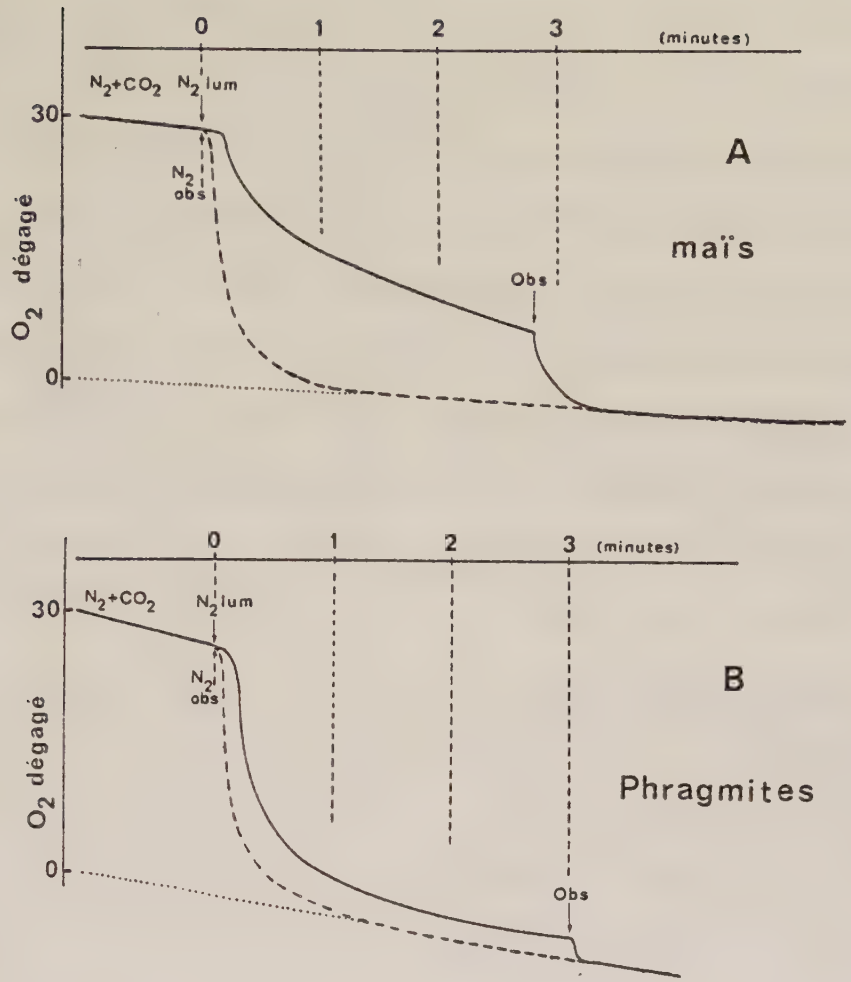



Figure 19

Evolution de la vitesse de dégagement d'oxygène au cours d'une transition photosynthèse (sous $N_2 + CO_2$)/$N_2$, à la lumière : courbes en traits continus. A : maïs ; B : Phragmites ; mesures effectuées avec une électrode de Clark. En ordonnées : vitesses de dégagement d'oxygène ($\mu mol.(mg\ Chl)^{-1}.h^{-1}$). Les courbes en tireté représentent l'évolution observée lors d'un arrêt immédiat du dégagement d'oxygène par passage à l'obscurité et sous azote.

correspond à une évolution observée dans le cas d'un arrêt immédiat du dégagement d'oxygène lors d'une interruption simultanée

de l'éclairement et de l'alimentation en $CO_2$ (condition expérimentale témoin) ; les deux courbes obtenues indépendamment sur la même feuille ont été superposées sur le schéma. On constate que chez Phragmites, la vitesse de dégagement d'oxygène est très faible sous azote, puisqu'elle n'est plus que 10% de la vitesse en photosynthèse (30 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$) après 30 secondes sous azote. En revanche, chez la feuille de maïs, la vitesse de dégagement d'oxygène diminue lentement sous azote : une vitesse initiale de 20-30 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ est fréquemment observée. La quantité d'oxygène dégagée est proportionnelle à l'aire comprise entre les courbes en traits plein et tireté ; les valeurs calculées sont, après 2 minutes sous azote, de 600 nanomol.(mg Chl)$^{-1}$ chez le maïs et de 22 chez Phragmites.

Ces résultats démontrent le déroulement d'une activité photosynthétique notable chez le maïs en dehors de tout approvisionnement en $CO_2$ (l'absence d'oxygène empêchant l'intervention de la photorespiration comme processus fournisseur de $CO_2$).

2. Etude cinétique de l'évolution des pools de composés du cycle de Calvin et d'acides C4 chez les feuilles de maïs illuminées sous azote. Comparaison avec Phragmites.

Protocole expérimental. Les feuilles de maïs et Phragmites, à l'équilibre isotopique avec le $^{32}P$, sont soumises dans une cellule d'expérience A, à des expériences semblables à celles qui viennent d'être décrites précédemment ; après l'établissement d'un état de photosynthèse stationnaire sous $N_2$+$CO_2$ en lumière monochromatique (650 nm), d'intensité 4 mW.cm$^{-2}$, les feuilles sont soumises à une transition $N_2$+$CO_2$/$N_2$ à la lumière. Pour certaines expériences, au cours du séjour sous azote, les feuilles sont mises à l'obscurité (transition "simple" lumière/obscurité sous azote) ; on rapporte également l'effet d'une transition "double" lumière-azote/obscurité-sous azote + $CO_2$.

Les composés sont séparés et dosés en utilisant les techniques décrites dans le chapitre Méthodes ; on effectue une électrophorèse haute-tension sur papier permettant de recueillir les composés à doser par une méthode enzymatique dans les échantillons : PGA et acides C4 ; une séparation bidimensionnelle électrophorèse-chromatographie permet de mesurer la radioactivité respective des différents composés à l'équilibre isotopique. Les composés phosphorylés (composés du cycle de Calvin autres que le PGA, PEP) sont dosés en application de la méthode d'équilibre isotopique. Les acides C4, malate et aspartate, sont dosés par des méthodes enzymatiques.

Résultats :

L'évolution des pools de composés du CRPP (PGA, DHAP, RuDP) et des acides C4 (malate et aspartate) a été étudiée après interruption de l'alimentation en $CO_2$, à la lumière. Chez le maïs et Phragmites, a suivi également l'évolution du pool de PEP (phosphoénolpyruvate), substrat présumé de la réaction de carboxylation conduisant à la synthèse d'oxaloacétate ; cette réaction, dans le texte anglais (extraits de la publication n° 2) est appelée β-carboxylation reaction.

a) Evolution des pools de 4 composés du CRPP (PGA, RuDP, DHAP, FruDP) sous azote à la lumière.

Cette étude cinétique a déjà été présentée au chapitre I, voir figure 17. Nous rappellerons un point important qui nous intéresse ici : chez le maïs l'évolution antiparallèle des pools de PGA et RuDP (diminution du PGA, augmentation du RuDP) n'est observée qu'après un temps de latence de 30-50 secondes pendant lequel la feuille doit utiliser du $CO_2$ appartenant à une réserve interne.

(b) β-carboxylation substrates and products

In corn, removal of $CO_2$ in the light, causes an immediate increase in the PEP pool and a sharp decrease in the aspartate pool *(Figure 20a).*

La mobilisation du pool d'aspartate est très rapide puisque le temps de demi-transformation est de 60-90 secondes. Une fraction du pool, soit 10-30% n'est pas mobilisable (ou très lentement).

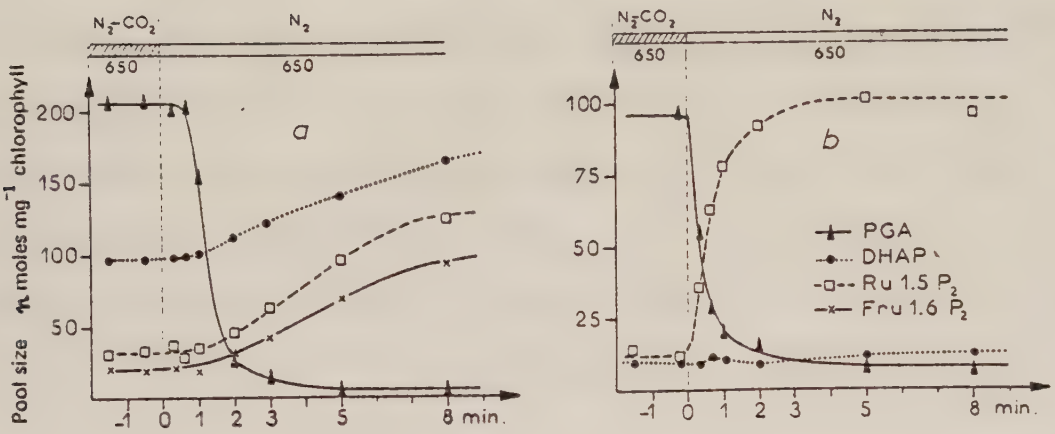



*Figure 17 Changes in pool sizes of some phosphorylated intermediates of the Calvin cycle in the light following removal of $CO_2$. (a) corn (b) Phragmites*

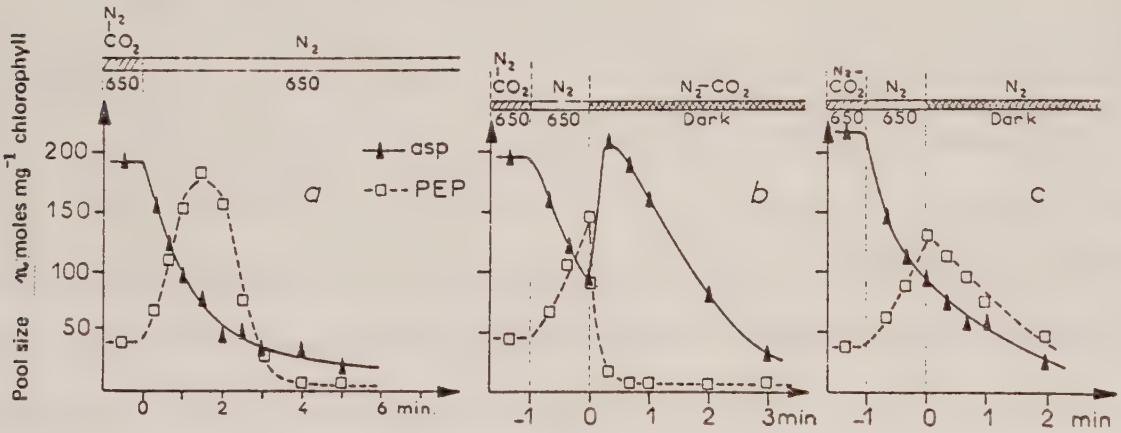



*Figure 20 Changes in the pool sizes of two compounds of the β-carboxylation pathway, following various transients.* (Maize)

A transitory increase of the aspartate level in the dark is observed only if $CO_2$ is present in the atmosphere *(Figure 20b,c)*.

Avec le matériel utilisé dans les expériences ci-dessus, c'est-à-dire des feuilles de maïs à teneur importante en malate (1-2 µmol.(mg Chl)$^{-1}$), nous n'avons pu mettre en évidence de diminution significative du pool de malate au cours des 3-5 premières minutes de séjour sous azote, cette variation devant être de l'ordre de grandeur des fluctuations de teneur en malate, soit 200-500 nmol. (mg Chl)$^{-1}$. En revanche, après 10-15 minutes sous azote, à la lumière, la diminution du pool de malate est clairement observée et peut atteindre 1000 nanomol.(mg Chl)$^{-1}$. Ainsi la mobilisation du pool de malate est plus lente que celle du pool d'aspartate ; la valeur du temps de demi-transformation est difficile à préciser.

Cependant des observations faites sur des feuilles à faible teneur en malate : 300-500 nanomol.(mg Chl)$^{-1}$ montrent que ce composé est mobilisé dès le début du balayage par l'azote (figure 21). Dans cette expérience, il apparaît clairement que la diminution du pool de malate est plus lente que celle du pool d'aspartate. On notera également chez ce matériel particulier une diminution immédiate et très rapide sous azote du pool de PGA : la cinétique d'évolution des composés du cycle de Calvin est semblable à celle observée chez une plante C3.

Nota :

Lors d'une transition photosynthèse/séjour sous azote, il est possible d'observer des cinétiques d'évolution des pools de PGA et RuDP, intermédiaires entre celles présentées dans les figures 17 et 21, à condition d'appauvrir les feuilles de maïs en malate et aspartate par un séjour de 1-2 minutes sous azote.

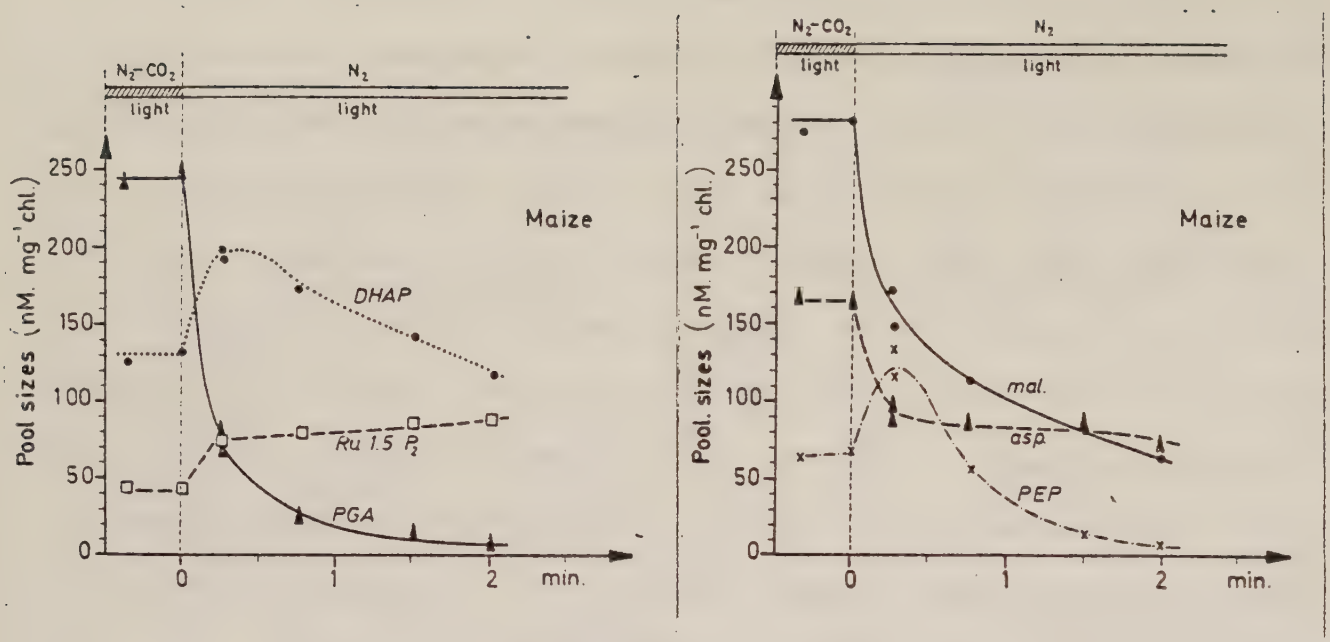



Figure 21

Etude cinétique de l'évolution des réservoirs de différents composés au cours d'une transition photosynthèse (sous $N_2$+$CO_2$)/séjour sous $N_2$, à la lumière, chez des maïs pauvres en malate (maïs cultivés en serre entre février et avril)

In *Phragmites* no changes in the aspartate or PEP pools are observed during transients, . Moreover, the PEP pool is very low (2-10 nmoles mg$^{-1}$ chlorophyll).

Remarques

1)

ze leaves the changes in pool sizes of the two $CO_2$ acceptors, RuDP and PEP, during the zero $CO_2$ treatment in the light are quite different. RuDP level in corn rose slowly over a period of many minutes *(Figure 17)* whereas that of PEP passes through a maximum within 2-3 min, then falls rapidly to a low level *(Figure* 20 a).

2) La suppression de la synthèse de NADPH et d'ATP au sein des feuilles par interruption de l'illumination (sous azote) devrait entraîner une accumulation immédiate du produit de carboxylation du cycle de Calvin, le PGA, dont la réduction cesse alors que la synthèse de ce composé devrait se poursuivre du fait de la présence d'un pool de RuDP notable

(l'accumulation de ce composé commence après 30-50 secondes sous

azote à la lumière (figure 17)). On observe effectivement une augmentation très marquée du pool de PGA chez le maïs, lors d'une transition lumière/obscurité sous azote : figure 22b ; l'augmentation est beaucoup plus faible chez Phragmites : figure 23b. Si la feuille est balayée au cours de la phase obscure avec un mélange $N_2$+$CO_2$, l'augmentation du pool de PGA est un peu plus importante que sous azote pur, chez le maïs : figure 22a ; en revanche, le pool de PGA augmente transitoirement de façon considérable chez Phragmites (Fig. 23a).

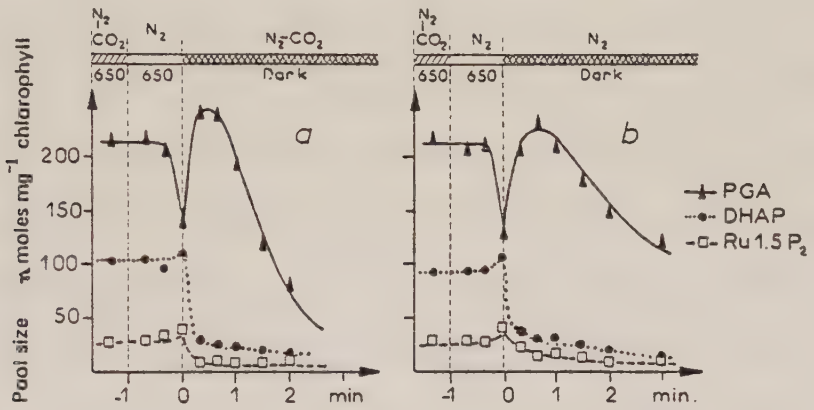



*Figure 22 Changes in the pool sizes of some phosphorylated intermediates of the Calvin cycle in corn leaves following removal of $CO_2$ in the light and subsequent transfer to the dark, (a) with or (b) without $CO_2$.*

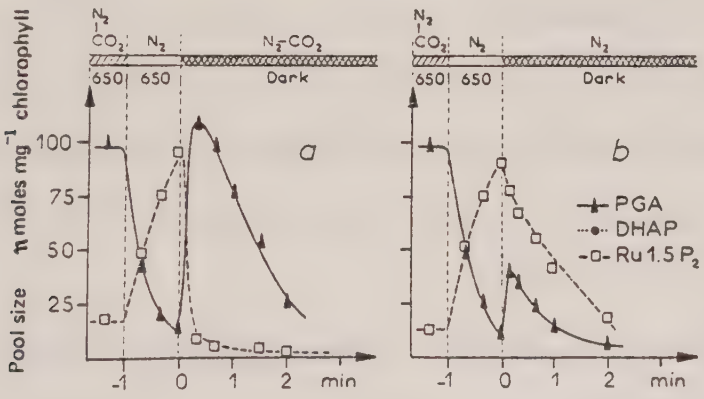



*Figure 23 Changes in the pool sizes of some phosphorylated intermediates of the Calvin cycle in Phragmites leaves. Conditions as in Figure 22.*

DISCUSSION - CONCLUSIONS.

1. Acides C4, réserve de $CO_2$.

Chez le maïs illuminé en atmosphère d'azote, la mise en évidence d'un important dégagement d'oxygène et le maintien d'une teneur élevée en PGA, au moins chez les feuilles à teneur normale en malate, montre qu'une activité photosynthétique continue à se dérouler au sein des feuilles privées d'approvisionnement en $CO_2$. Ce dernier composé nécessaire à l'évolution du cycle de Calvin semble être puisé dans la réserve cellulaire d'acides C4, malate et aspartate, dont la teneur décroît dès le début de la période de privation de $CO_2$. Le $CO_2$ pourrait provenir de la décarboxylation du malate catalysée par l'enzyme malique : l'activité de cette enzyme dans les feuilles de maïs est en effet très importante (300-500 $\mu mol.(mg\ Chl)^{-1}.h^{-1}$). Aucune décarboxylase de l'aspartate n'ayant, à notre connaissance, pu être mise en évidence chez le maïs, on peut penser que cet acide C4 est successivement transformé en oxaloacétate puis malate selon la séquence :

$$\text{aspartate} \xrightleftharpoons[\text{glutamate}]{1\ \text{oxoglutarate}} \text{oxaloacétate} \xrightarrow{2\ \text{NADPH}} \text{malate}$$

- réaction 1 catalysée par l'aspartate aminotransférase (réversible)
- réaction 2 catalysée par la malate déshydrogénase (NADP) (réaction réverse très lente).

Cependant l'oxaloacétate, composé très instable, peut être aussi à l'origine d'une production de $CO_2$.

Une fraction importante (80%) du pool d'aspartate est mobilisée sous azote en quelques minutes, le temps de demi-transformation étant d'environ 1 minute. Une fraction variable du pool de malate, soit 20-80% représentant 0,5-1 $\mu mol.(mg\ Chl)^{-1}.h^{-1}$ est transformée plus len-

tement ; il est probable que le malate est présent dans les feuilles sous deux formes, l'une rapidement mobilisable (cytoplasmique) et l'autre plus lentement (réserve accumulée dans la vacuole) ainsi qu'on l'a déjà suggéré [Galmiche, 1973a,b].

Les pools d'acides C4 mobilisables, d'importance très variable selon les feuilles de maïs représentent 0,4 à 1,5 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ la quantité d'oxygène dégagée au cours de 2 minutes de séjour sous azote, 0,6 µmol.(mg Chl)$^{-1}$, est en rapport avec la quantité d'acides C4 mobilisable en atmosphère sans $CO_2$.

En conclusion, une fraction des pools cellulaires de malate et d'aspartate est susceptible,après transformation,de fournir du $CO_2$ utilisé pour le déroulement du cycle de Calvin, au moins en atmosphère d'azote. A la suite d'une étude effectuée sur des feuilles de maïs en photosynthèse stationnaire, Galmiche [1973a] est arrivé à une conclusion semblable. La cinétique de marquage par le $^{14}C$ du PGA au cours d'une chase sous air + $^{12}CO_2$, après une période d'alimentation par le $^{14}CO_2$ de quelques secondes, s'interprète en admettant que le $CO_2$ fixé par le RuDP provient de la décarboxylation d'une fraction du pool cellulaire d'acides C4 ; ce pool renouvelable est estimé à 540 nanomoles/g de poids frais, soit environ 180 nanomoles/mg de chlorophylle. Il comprend la quasi totalité du pool d'aspartate et 20% du pool de malate ; cependant, les maïs utilisés avaient une faible teneur en malate : 0,3-0,7 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.

Plusieurs auteurs ont supposé l'existence d'un pool intracellaire de $CO_2$ qui serait alimenté en permanence par la décarboxylation des acides C4 [Berry et al., 1970 ; Hatch, 1971a]. Ce dernier auteur a pu évaluer ce pool chez le maïs à 70 nanomoles/g de poids frais, en photosynthèse ; la valeur trouvée chez une feuille à l'obscurité est 10 fois plus faible. En outre il devrait être possible de mettre en

évidence, chez les feuilles de plantes C4, une production de $CO_2$ à partir des acides C4, à condition d'empêcher le déroulement de la photosynthèse. Des chercheurs du CEN de Cadarache ont effectivement pu montrer que les feuilles de maïs libèrent du $CO_2$ sous azote et à l'obscurité [Guérin de Montgareuil et al., 1967] ; une observation analogue a été faite par Berry et al. [1970]. Les premiers auteurs ont montré que ce dégagement est en rapport avec la présence d'une réserve d'aspartate, rapidement mobilisée, et de malate, beaucoup plus stable [Michel, 1971 ; Créach et al., 1974]. Lorsque les feuilles de maïs, après une période de quelques minutes sous azote, à l'obscurité, sont illuminées (sous azote) avec une lumière excitant le "Photosystème II" (lumière monochromatique 480 nm), un dégagement d'oxygène se manifeste après un temps de latence de 1 à 2 minutes [Guérin de Montgareuil et al., 1967]. Pendant ce temps de latence à l'émission d'oxygène, la libération de $CO_2$ persiste, mais cesse dès l'apparition de la vague d'oxygène [Thibault, 1973]. Ces derniers résultats sont en accord avec l'hypothèse d'une utilisation du $CO_2$ provenant de la décarboxylation des acides C4 pour le déroulement de la photosynthèse sensu stricto (cycle de Calvin).

2. Evolution des pools de composés phosphorylés en atmosphère d'azote et à l'obscurité chez le maïs.

Les expériences rapportées dans les figures 22 et 23 ont consisté à suivre l'évolution des pools de PGA, RuDP et DHAP en atmosphère d'$N_2$ ou de $N_2$-$CO_2$, à l'obscurité, chez des feuilles préalablement illuminées 1 minute sous azote pur ; ce dernier traitement a pour effet de diminuer le pool de PGA, et d'augmenter celui de RuDP.

Les résultats expérimentaux indiquent que la fourniture de $CO_2$ aux feuilles à l'obscurité n'a que peu d'effet sur la synthèse de PGA chez le maïs, laquelle se manifeste immédiatement, dès la ces-

sation de l'illumination. Ce résultat semble indiquer qu'une réserve de $CO_2$ importante, utilisée pour la synthèse de PGA par carboxylation du RuDP, est présente dans la feuille de maïs. On remarque d'ailleurs que la diminution du pool de RuDP est rapide à l'obscurité, même sous azote. Cependant, on notera que l'augmentation transitoire du pool de PGA est accompagnée d'une diminution parallèle de 80% du pool de DHAP (figure 22a, b). Nous appuyant sur une hypothèse formulée par Gibbs [1971], nous pensons que une fraction importante du pool de PGA synthétisé à l'obscurité (120-150 nanomol.(mg Chl)$^{-1}$), sous $N_2$ ou sous $N_2$-$CO_2$, doit provenir de la transformation réverse du DHAP en PGA catalysée par les trioses phosphate déshydrogénases. La fraction restante (environ 50 nanomol.(mg Chl)$^{-1}$) pourrait provenir de la carboxylation du RuDP. Nous montrerons plus loin que du PGA peut être effectivement synthétisé par carboxylation du RuDP, dans les premières secondes d'une période d'obscurité à condition de fournir le $^{14}CO_2$ par infiltration dans les vaisseaux sous forme de bicarbonate.

3. Métabolisme du PEP ; son rôle en photosynthèse.

Nous examinerons cette question en raison de son importance.

L'augmentation immédiate du pool de PEP lors d'une transition $N_2$+$CO_2$/$N_2$, à la lumière est observée chez les feuilles de maïs quelle que soit l'importance de leurs réserves en acides C4 : Figures 20-21. Cette évolution du pool est une démonstration du rôle du PEP comme substrat de la réaction de carboxylation du cycle des acides C4 fournissant de l'oxaloacétate. Les évolutions des pools de PEP et PGA, pendant les premières secondes sous azote sont antiparallèles (le pool de PGA étant stable ou en diminution, le pool de PEP augmentant, figures 17, 20, 21), puis la diminution du pool de PEP suit celle du PGA avec un retard d'environ 90 secondes. A la différence du RuDP, le PEP ne s'accumule pas sous azote, à la lumière.

Laber et al. [1974] ont également observé de très faibles teneurs en PEP chez des feuilles de maïs illuminées pendant une longue période (25-35 minutes) en atmosphère d'azote +1,5% d'$O_2$ ; ce résultat a conduit les auteurs précédents à mettre en doute l'hypothèse selon laquelle le PEP serait un accepteur primaire de $CO_2$. En fait, comme nous l'avons montré, l'augmentation du pool de PEP en atmosphère sans $CO_2$ est transitoire, et peut de ce fait passer inaperçue. La cause même de cette absence d'accumulation de PEP n'est pas claire. Laber et al admettent que le PEP dérive du PGA par déroulement de la glycolyse,ce qui pourrait effectivement expliquer les faibles teneurs en PEP observées chez les feuilles appauvries en PGA. Cependant il est vraisemblable qu'une importante fraction du pool de PEP est également synthétisée par phosphorylation du pyruvate : la réaction est catalysée par la pyruvate phosphate dikinase dont l'activité est d'environ 120 $\mu mol.(mg\ Chl)^{-1}.h^{-1}$) dans les feuilles de maïs, (observation personnelle). Le métabolisme du pyruvate dans la feuille de maïs étant mal connu, nous ne formulerons pas d'explication au sujet de l'absence apparente de synthèse du PEP à partir du pyruvate chez la feuille placée sous azote.

## B. MODES D'UTILISATION DU $CO_2$ ATMOSPHERIQUE EN PHOTOSYNTHESE, CHEZ LE MAIS.

Nous avons montré précédemment (chapitre II, A) que le $CO_2$ provenant de la décarboxylation d'une fraction des pools d'acides C4 est utilisé pour alimenter les sites de carboxylation du cycle de Calvin, chez la feuille de maïs illuminée sous azote. Il importe maintenant de déterminer si, lorsque la feuille reçoit du $CO_2$ sous forme de $CO_2$ atmosphérique, le pool d'acides C4 représente un intermédiaire obligatoire pour l'alimentation du cycle de Calvin en $CO_2$, ou si une alimentation directe de la RuDP carboxylase par le $CO_2$ atmosphérique

est possible. En d'autres termes, le $CO_2$ atmosphérique doit-il transiter obligatoirement par le pool d'acides C4 du mésophylle avant d'être fixé dans le PGA (première hypothèse, figure 24) ? Sinon, on doit admettre que le $CO_2$ entrant dans la feuille se partage entre deux voies métaboliques de synthèse : celle des acides C4 et le CRPP (hypothèse n° 2, figure 24). Selon cette hypothèse, les deux voies de synthèse pourraient se dérouler indépendamment l'une de l'autre ; la synthèse des acides C4 serait une voie annexe d'utilisation du $CO_2$ atmosphérique, le CRPP ayant seul une importance physiologique réelle puisqu'il assure la fixation nette du $CO_2$ dans les composés terminaux du métabolisme photosynthétique.

Pour choisir entre ces deux hypothèses, nous avons élaboré deux types d'approches expérimentales visant à limiter l'intervention des acides C4 du mésophylle en photosynthèse.

Dans la première approche, nous avons étudié l'effet d'un prétraitement (consistant à faire séjourner les feuilles de maïs pendant une durée variable en atmosphère d'azote, à la lumière) sur la fixation ultérieure du $^{14}CO_2$ fourni pendant un temps court (6 secondes) dans la même atmosphère (azote) et à la lumière. Un prétraitement de plus de 3 minutes (voir II a) a pour effet de diminuer considérablement la teneur des feuilles en acides C4 et en PEP, accepteur de $CO_2$ de la voie de synthèse des acides C4 (figure 20a). En conséquence l'intervention des acides C4 en photosynthèse devrait être très limitée si l'on accepte la deuxième hypothèse (partage du $CO_2$ atmosphérique entre deux voies métaboliques) : le métabolisme C4 devrait faire place à un métabolisme C3, ce qui devrait se traduire par une diminution considérable du marquage des acides C4 relativement à celui des composés du CRPP, alors que la quantité totale de $^{14}C$ incorporée dans ces derniers composés devrait augmenter puisque le pool d'accepteur de $CO_2$ du CRPP

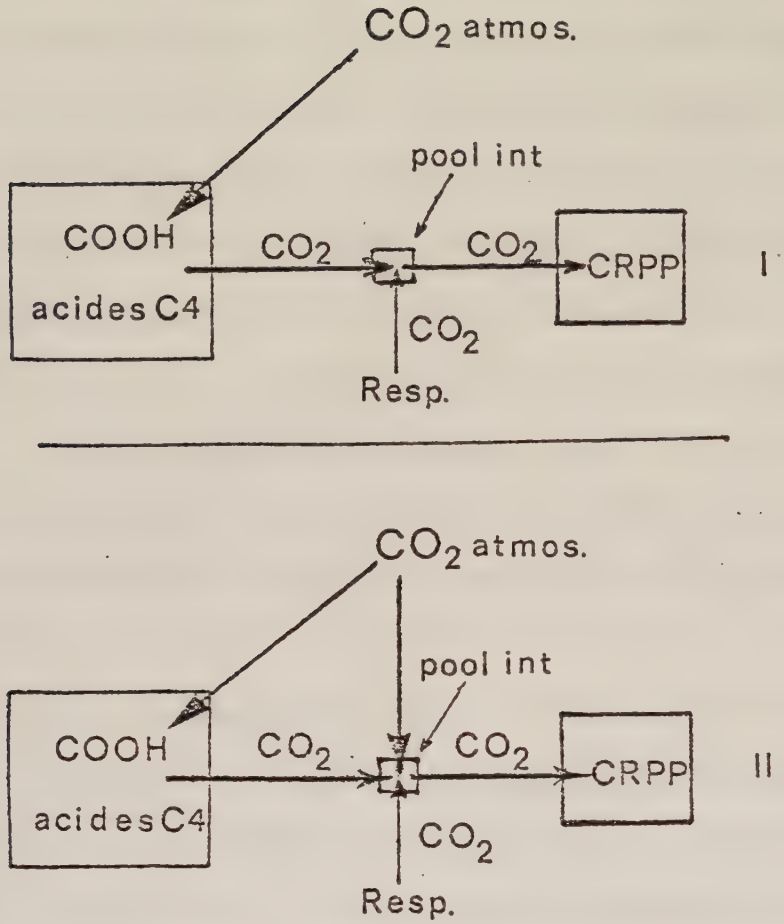



Figure 24

Hypothèses relatives aux modalités du transfert du $CO_2$ atmosphérique au sein de la feuille de maïs, en photosynthèse. I : première hypothèse ; II : deuxième hypothèse. $CO_2$ atmos. : $CO_2$ atmosphérique ; COOH acides C4 : pool constitué par les carboxyles 4 des acides C4 ; pool int. : pool interne de $CO_2$ ; Resp. : respiration et photorespiration.

(le RuDP) augmente sous azote et à la lumière (figure 17a et tableau 7). En revanche, dans l'hypothèse où le $CO_2$ atmosphérique doit obligatoirement transiter dans le pool d'acides C4 pour alimenter le pool interne de $CO_2$ (première hypothèse), on doit s'attendre à une diminution de l'incorporation du $^{14}C$ dans l'ensemble des composés qui soit parallèle à la diminution du pool de PEP. La durée de la période d'alimentation par le $^{14}CO_2$ (mélange $N_2$+$^{14}CO_2$) doit être très courte pour limiter la

régénération des accepteurs de $CO_2$ (PEP) ou des intermédiaires : (malate, aspartate, PGA ...). En outre, une expérience témoin a été faite sur une plante C3, Phragmites, pour déceler d'éventuels effets d'inhibition provoqués par un séjour sous azote, à la lumière, sur la vitesse de fixation du $^{14}CO_2$ dans cette atmosphère.

Nous avons également testé l'effet d'un prétraitement en deux étapes : après un prétraitement par l'azote, à la lumière de 55 secondes, les feuilles ont été mises à l'obscurité, puis alimentées en $^{14}CO_2$ (mélange $N_2$+$^{14}CO_2$) pendant les <u>premières secondes</u> de cette période d'obscurité. Les résultats obtenus chez le maïs ont été discutés longuement.

Dans la deuxième approche, le $CO_2$ a été donné aux feuilles, sous forme de bicarbonate, par infiltration ; ainsi le $CO_2$ a été fourni directement aux cellules de la gaine en <u>évitant le pool d'acides C4 du mésophylle</u>. Grâce à ce type d'expériences, il sera également possible de mettre en évidence un éventuel fonctionnement en photosynthèse de ces cellules qui, selon Hatch [1971b] seraient les seules de la feuille à renfermer une activité RuDP carboxylase.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL.

a) <u>Alimentation de courte durée par le $^{14}CO_2$</u>

Les feuilles de maïs ou Phragmites (200 mg de limbe) sont placées dans une cellule à trappe prévue pour ce type d'expériences : voir METHODES et TECHNIQUES et Galmiche [1973b]. Dans une première étape, les feuilles sont éclairées en lumière monochromatique (650 nm) sous atmosphère de $N_2$+0,5% de $CO_2$ jusqu'à la réalisation d'un état stationnaire en photosynthèse, puis la cellule est balayée par un courant d'azote pur pendant une durée variable : cette deuxième phase correspond au prétraitement, lequel consiste soit en une période d'illumination continue, soit en 55 secondes d'éclairement suivi de 5 se-

condes d'obscurité : voir tableaux 9 et 10. Sans modifier les conditions expérimentales, le $^{14}CO_2$ est introduit dans la cellule en fin de prétraitement ; le $^{14}CO_2$ est dilué dans l'azote pur (80 µCi de $^{14}CO_2$, teneur maximale en $CO_2$ 0,1%) et poussé à un débit rapide (3 l/min) pendant 6 secondes, ce qui assure la passage de la vague radioactive pendant 3 secondes, puis un balayage par de l'azote ne contenant plus que des traces de $^{14}CO_2$, pendant 3 secondes (voir Galmiche, [1973b]). Les feuilles sont fixées en fin d'expérience par l'azote liquide, puis analysées pour leur teneur en composés marqués par les techniques habituelles : séparation bidimensionnelle sur papier (pour l'analyse de la distribution du $^{14}C$ dans les composés) et électrophorèse préparative sur papier (pour évaluer la quantité totale de radioactivité fixée).

b) Infiltration de bicarbonate marqué au $^{14}C$.

Les fragments de feuilles de maïs sont placés dans la cellule d'expérience B (voir METHODES). La base des feuilles trempe dans un volume minimum d'eau pendant le prétraitement sous azote. Le bicarbonate est injecté dans l'augette en fin de prétraitement (environ 300 µCi sans entraîneur) et immédiatement infiltré dans les vaisseaux des feuilles en faisant le vide pendant 3 secondes sur la chambre. Les feuilles sont ensuite rapidement prélevées, fixées dans l'azote liquide ; les zones de limbe conservées pour l'analyse sont celles qui n'ont pas été directement au contact du bicarbonate.

RESULTATS.

1. Effets de prétraitements sur la fixation du $^{14}CO_2$ (alimentation par voie gazeuse).

Dans le tableau 9 sont rassemblés les résultats d'expériences ayant consisté à étudier l'effet du prétraitement (séjour sous azote)

sur la vitesse d'incorporation du $^{14}CO_2$ dans les composés du métabolisme C4 : cette vitesse est mesurée par la quantité totale de $^{14}C$ incorporé pendant une même période d'alimentation par le $^{14}CO_2$ (6 secondes). On rapporte également pour chaque expérience la répartition de la radioactivité entre acides C4 et composés du CRPP et la distribution de radioactivité au sein de ces derniers composés.

Dans le tableau 10 sont présentés les résultats obtenus avec Phragmites, plante C3 soumise aux mêmes prétraitements avant l'alimentation par le $^{14}CO_2$.

a) Incorporation de $^{14}CO_2$ à la lumière.

Chez le maïs en photosynthèse normale (témoin, tableau 9), 20% du $^{14}C$ est fixé dans les composés du CRPP, et principalement dans le PGA. A la suite d'un prétraitement de courte durée sous azote, à la lumière, inférieur ou égal à une minute (exp. 2 et 3, tableau 9) on constate que la distribution du $^{14}C$ au sein des composés du CRPP est peu modifiée (voir la différence avec Phragmites, tableau 10) alors que la quantité totale de $^{14}C$ fixé augmente au fur et à mesure que le séjour sous azote se prolonge. Le premier résultat indique que la privation de $CO_2$ ne perturbe pas le déroulement du cycle de Calvin, ce qui confirme l'observation faite sur la stabilité des pools d'intermédiaires du CRPP, pendant 30-40 secondes sous azote, chez des feuilles à teneur normale en malate (figure 17a). La seconde observation peut s'expliquer par le fait que la fixation totale de $CO_2$ est effectivement plus importante, chez une feuille dont les pools de PEP et de RuDP, accepteurs de $CO_2$ des deux voies de synthèses, augmente sous azote (figures 17a, 20a - l'augmentation du pool de PEP n'étant que transitoire). Pour des séjours de plus longue durée sous azote : 5 minutes et plus, on observe :

| Exp. | Prétraitement | Rad.totale fixée (ipm x $10^{-6}$) | Acides C4 Rad : ipm x $10^{-6}$ (% total) | | Composés du CRPP | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Rad : ipm x $10^{-6}$ (% total) | Distribution dans composés du CRPP- Rad : ipm x $10^{-6}$ (% total CRPP) | | |
| | | | malate | aspartate | | 3 PGA | SDP | DHAP |
| 1 | Témoin, $N_2$+$CO_2$ | — | (59) | (21) | (20) | (92) | (3) | (2) |
| 2 | 25 secondes $N_2$ lumière | 3,74 | 1,83 (49) | 0,97 (26) | 0,9 (24) | 0,8 (88) | 0,055 (6) | 0,03 (3) |
| 3 | 60 secondes $N_2$ lumière | 6,29 | 2,2 (35) | 1,5 (24) | 2,6 (41) | 1,8 (70) | 0,3 (13) | 0,26 (10) |
| 4 | 5 minutes $N_2$ lumière | 2,21 | 0,68 (31) | 0,44 (20) | 1,08 (49) | 0,39 (36) | 0,45 (42) | 0,17 (16) |
| 5 | 8 minutes $N_2$ lumière | 1,40 | 0,41 (29) | 0,28 (20) | 0,71 (51) | 0,22 (31) | 0,33 (47) | 0,13 (19) |
| 6 | 55 secondes $N_2$ lumière + 5 sec. $N_2$ obscurité | 6,05 | 3,6 (59) | 2,2 (37) | 0,24 (4) | 0,22 (92) | 0,05 (2) | 0,02 (1) |

Tableau 9 Maïs. Effets de prétraitements consistant en des séjours de durée variable en atmosphère d'azote, après une période de photosynthèse stationnaire sous azote + 0,5% de $CO_2$, sur la vitesse de fixation du $^{14}CO_2$ et la distribution du $^{14}C$ dans divers composés (voir Protocole et texte). Dans les expériences 2 à 6, le $^{14}CO_2$ est fourni dilué dans de l'azote pur ; dans l'expérience 1 (témoin en photosynthèse sous $N_2$+0,5% $CO_2$) le $^{14}CO_2$ est dilué dans ce mélange gazeux. SDP : sucres diphosphorylés (RuDP, FruDP).

α) une diminution marquée de la vitesse d'incorporation du $^{14}CO_2$ ;

β) la distribution du $^{14}C$ dans l'ensemble des composés est modifiée profondément : le marquage du PGA est réduit à l'avantage de celui des sucres diphosphorylés - dans ces expériences, le marquage des intermédiaires devant être sensiblement proportionnel à la taille des pools de composés, le résultat observé s'explique aisément par l'appauvrissement des feuilles en PGA et par leur enrichissement en RuDP.

ϑ) La quantité de $^{14}C$ incorporée dans les composés du CRPP diminue en valeur <u>absolue</u> mais continue à croître aux dépens de celle fixée dans les acides C4 : ce dernier phénomène (augmentation <u>relative</u> d'incorporation dans les composés du CRPP) est déjà observé au début du prétraitement par l'azote et très net dans l'expérience 3 ; cependant le pourcentage d'incorporation dans les composés du CRPP se maintient à une valeur proche de 50% même pour des séjours de très longue durée sous azote (20-30 minutes) : après un tel prétraitement l'incorporation totale de $^{14}C$ dans l'ensemble des composés est très faible : 1-3% de celle de l'expérience 3, tableau 9.

Chez Phragmites (tableau 10), la vitesse de fixation du $CO_2$ en atmosphère d'azote reste sensiblement la même après des prétraitements variant de 1 à 5 minutes sous azote à la lumière. Un séjour prolongé entraîne pourtant une diminution d'incorporation sensible : 30%, après 8 minutes sous azote, qui peut traduire l'inactivation de certaines enzymes du cycle de Calvin.

| Exp. | Prétraitement | Rad.totale fixée ipm x $10^{-6}$ | Distribution dans co composés du CRPP Rad : ipm x $10^{-6}$ - (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 3 PGA | SDP | DHAP |
| 1 | Témoin ($N_2$+$CO_2$ | - | (90) | (2) | (6) |
| 2 | 1 minute $N_2$ lumière | 4,55 | 0,45 (10) | 3,15 (69) | 0,18 (4) |
| 3 | 5 minutes $N_2$ lumière | 4,15 | 0,46 (11) | 2,8 (68) | 0,21 (5) |
| 4 | 8 minutes $N_2$ lumière | 2,90 | 0,26 (9) | 2,05 (71) | 0,18 (6) |
| 5 | 55 secondes $N_2$ lumière + 5 secondes $N_2$ obscurité | 4,20 | 3,75 (89) | 0,08 (2) | 0,04 (1) |

Tableau 10 Phragmites. Effets de prétraitements sur la vitesse de fixation du $^{14}CO_2$ et la distribution du $^{14}C$ dans divers composés du CRPP. Expériences identiques à celles réalisées sur le maïs : voir tableau 9.

Interprétations - Conclusions.

Le déroulement des deux activités métaboliques caractéristiques de la photosynthèse C4 : synthèse des composés du CRPP et des acides C4, a pu être mis en évidence chez les feuilles de maïs préalablement illuminées en atmosphère d'azote, grâce à un marquage des intermédiaires par le $^{14}C$. Certes, les prétraitements provoquent des perturbations métaboliques, mais on n'observe pas d'évolution d'un métabolisme C4 vers un métabolisme C3.

L'incorporation totale de $^{14}C$ dans les composés du CRPP diminue de façon importante lorsque les prétraitements sont prolongés au-delà d'une minute : ainsi l'incorporation de $^{14}C$ après 5 minutes

d'illumination sous azote (exp. 4) n'est que 40% de celle observée dans l'expérience 3 ($^{14}CO_2$ donné après 1 minute de prétraitement) ; on note cependant une légère augmentation, en valeur relative, du marquage des composés du CRPP aux dépens des acides C4. Si la deuxième hypothèse était vraie, on devrait observer une diminution nette, en valeur absolue, du marquage des composés du CRPP lorsque la teneur des feuilles en PEP devient très faible, et le pool de RuDP plus important (cas de l'expérience 4) ; en effet selon cette hypothèse, l'alimentation en $^{14}CO_2$ des sites de la RuDPC ne devrait plus être assurée que par le $CO_2$ atmosphérique lorsque la voie de synthèse des acides C4 est fortement perturbée par manque de PEP - si l'on suppose toutefois un accès normal du $CO_2$ externe aux sites de la RuDPC. Notons enfin que, dans le cas de l'expérience 4, il paraît probable que le fonctionnement du cycle de Calvin ne soit pas perturbé par un prétraitement sous azote de 5 minutes, si l'on étend au maïs l'observation faite chez Phragmites (exp. 4, tableau 9 et exp. 3 tableau 10).

Ainsi les résultats de l'expérience 4 sont plutôt en accord avec l'hypothèse n° 1 selon laquelle le $^{14}CO_2$ doit d'abord être fixé dans le pool d'acides C4 avant d'être transféré dans celui des composés du CRPP ; le faible marquage des derniers composés (en valeur absolue) serait dû à une moindre incorporation initiale du $^{14}CO_2$ atmosphérique dans le pool précurseur, celui des acides C4.

Remarque. L'augmentation relative d'incorporation du $^{14}C$ dans les composés du CRPP au dépens du marquage des acides C4 peut s'expliquer également dans le cadre de l'hypothèse n° 1. Le séjour sous azote, à la lumière a pour effet de diminuer le pool cellulaire d'acides C4 alors que le pool total d'intermédiaire du CRPP est pratiquement invariant, la diminution de teneur en PGA étant compensée par l'augmentation des pools de DHAP et RuDP (figure 17a). Chez le témoin en photosynthèse, et chez les feuilles laissées un temps bref sous azote, le $^{14}CO_2$ se diluera dans un pool important d'acides C4 avant d'aller

alimenter les intermédiaires du CRPP ; le $^{14}CO_2$ subira une forte dilution isotopique au cours de son (bref) passage dans le mésophylle. En revanche, chez les feuilles appauvries en acides C4, la dilution isotopique sera moindre, et le marquage relatif des composés du CRPP, comparé à celui des acides C4, plus important. Cependant, la quantité absolue de $^{14}C$ fixé ne dépend, dans toutes les conditions expérimentales que de la quantité totale de $^{14}CO_2$ fixée initialement par la PEP carboxylase (hypothèse 1).

Nous examinerons maintenant les résultats d'une expérience qui nous permettent de nous déterminer avec plus de sureté en faveur de la première hypothèse.

b) Incorporation de $^{14}CO_2$ à l'obscurité.

Lorsque le $^{14}CO_2$ est fourni à des feuilles de maïs dans les premières secondes d'obscurité suivant une période d'illumination sous azote à la lumière : expérience 6, tableau 9, la quantité de $^{14}C$ incorporée dans les composés du CRPP est très faible : 4% du $^{14}C$ fixé, alors que la vitesse de fixation du $^{14}CO_2$ ($^{14}C$ incorporé dans l'ensemble des composés) n'est pas différente de celle observée à la fin d'un prétraitement identique à la lumière (exp. 3). De même chez Phragmites, l'interruption de l'illumination ne modifie pas sensiblement la vitesse d'incorporation du $^{14}C$ dans l'ensemble des composés - il s'agit ici des composés du CRPP, les seuls marqués chez cette plante C3 : exp. 5 comparée à l'expérience 2, tableau 10. Chez le maïs et chez Phragmites, le principal composé du CRPP marqué à l'obscurité est le PGA puisque environ 90% de la radioactivité fixée s'y trouve accumulé. Ce résultat s'interprète de façon simple en admettant que la réaction de carboxylation peut se dérouler à l'obscurité alors que l'arrêt simultané des synthèses de NADPH et d'ATP empêche la réduction du PGA formé en trioses phosphate [Miyachi et al., 1970].

Chez le maïs, l'existence d'un fort marquage des acides C4 à l'obscurité démontre le fonctionnement de la PEPC. En revanche, le marquage des composés du CRPP est très faible ce qui peut s'interpréter de deux manières :

α) le fonctionnement de la RuDPC est perturbé (par suite d'une inactivation enzymatique ?) ;

β) la RuDPC est fonctionnelle, mais l'approvisionnement en $CO_2$ externe de l'enzyme est rendu difficile ou impossible. Si l'interprétation β) est valable, ce résultat serait uniquement en accord avec la première hypothèse (isolement des sites de la RuDPC de l'atmosphère).

On exclut le fait que la teneur des feuilles en RuDP soit limitante ; en effet, le pool de ce composé est sensiblement le même après 5 secondes d'obscurité et à la fin de la phase d'éclairement (voir figure 22b qui montre la vitesse d'évolution du pool de RuDP sous azote, à l'obscurité). L'étude effectuée sur Phragmites ayant permis de démontrer que la fixation de $^{14}CO_2$ - et par conséquent la synthèse de PGA, s'effectue à une vitesse égale à l'obscurité (premières secondes d'obscurité) et à la lumière (tableau 11), il est clair que chez cette espèce, la RuDPC est parfaitement fonctionnelle dans les premières secondes d'une période d'obscurité. Il serait surprenant que ce résultat ne puisse être étendu aux plantes C4. Nous nous sommes efforcé de montrer la possibilité d'une synthèse de PGA à l'obscurité chez le maïs ; pour prouver l'existence d'un blocage du transfert du $CO_2$ atmosphérique vers les composés du CRPP, se situant au niveau de l'intervention des acides C4 du mésophylle, le $CO_2$ a été fourni à la feuille sous forme de bicarbonate, par infiltration sous vide dans les vaisseaux : cette voie directe évite le pool d'acides C4 du mésophylle.

2. Alimentation des feuilles en bicarbonate-$^{14}C$ par infiltration.

Le bicarbonate-$^{14}C$ a été fourni par infiltration aux feuilles de maïs soit après une période de photosynthèse stationnaire, ou à la fin d'un prétraitement consistant en 55 secondes d'illumination sous azote puis 5 secondes d'obscurité dans la même atmosphère: tableau 11.

| Prétraitements | Radioactivité incorporée : ipm x $10^{-3}$ - (% Rad. totale inc.) | | | | Rad. totale incorporée ipm x $10^{-3}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| | Composés du CRPP | | Acides C4 | | |
| | | | Mal. | Asp. | |
| Photosynthèse (témoin) | 41 (63) | PGA 18(28)<br>HMP 12(18) | 18 (28) | 6 (9) | 65 |
| 55 secondes $N_2$ lumière + 5 sec. $N_2$ obscurité | 54 (55) | PGA 40(41)<br>HMP 14(14) | 30 (31) | 14 (14) | 98 |

Tableau 11 Maïs Effet de prétraitements sur la distribution du $^{14}C$ dans les acides C4 et les composés du cycle de Calvin ; alimentation en bicarbonate-$^{14}C$ des feuilles par infiltration sous vide (3 secondes de vide). Radioactivité totale incorporée : imp x $10^{-3}$ ; HMP : hexoses monophosphates (glucose 6 P et Fru 6P). Mal. : malate, Asp. : aspartate.

L'incorporation de $^{14}C$ dans les composés du CRPP est très importante, en valeur relative (pourcentage), à la suite de l'alimentation par le bicarbonate marqué à l'obscurité : ces résultats diffèrent de façon frappante de ceux obtenus lors d'une alimentation en $CO_2$ par voie gazeuse, après le même prétraitement : exp. 6, tableau 9. Ainsi, il est clair que les cellules de la gaine peuvent synthétiser du PGA dans les premières secondes d'une période d'obscurité à condition d'être alimentées directement en $CO_2$ par infiltration : les cellules de la gaine sont en effet les premières à recevoir le $CO_2$ dans ce type d'expé-

rience. Le marquage du malate et de l'aspartate résulte probablement de la fixation de $CO_2$ au sein du mésophylle après transfert du dernier composé à partir de la gaine. Un résultat très voisin a été obtenu par Rathnam et Das [1975a] avec Eleusine coracana (plante C4 du groupe 3) : chez les feuilles alimentées en bicarbonate-$^{14}C$ par infiltration, pendan 5 secondes, en photosynthèse, le $^{14}C$ est retrouvé accumulé dans le PGA.

Remarque : On ne dispose pas, malheureusement, dans ce type d'expériences, de données quantitatives sur la vitesse de consommation du bicarbonate par les cellules : cette vitesse pourrait être très faible et le phénomène étudié d'importance secondaire. Pour répondre à cette objection, nous avons été amené à préparer des gaines périvasculaires isolées afin d'étudier leur capacité d'assimilation du $CO_2$ en photosynthèse ; les résultats sont présentés dans la deuxième partie du mémoire. Ils permettent de conclure que les cellules in vitro synthétisent du PGA à la lumière : 60-90% du $^{14}C$ est incorporé dans le PGA, en présence de substrats exogènes; la vitesse de fixation du $CO_2$ est comparable à celle de cellules isolées de feuilles d'épinard, une plante C3. En conséquence, on ne peut contester que les cellules de la gaine in situ (dans la feuille) puissent fixer effectivement du $CO_2$ à un taux notable au cours du fonctionnement photosynthétique.

CONCLUSION.

Les feuilles de maïs sont aptes à synthétiser du PGA à l'obscurité ; des sites de la RuDPC sont mis en évidence dans les cellules de gaine. En conséquence, il apparaît que le faible marquage des composés du CRPP lors d'une alimentation par voie gazeuse après 5 secondes d'obscurité, traduit un blocage du transfert du $CO_2$ du pool des carboxyles des acides C4 vers les composés du CRPP. Cependant on ne peut exclure la possibilité d'une légère inactivation de la RuDPC à l'obscurité qui contribuerait également à diminuer l'incorporation du $^{14}C$ dans le PGA et les autres composés du CRPP.

Ainsi, conformément à la première hypothèse, les sites de la RuDPC sont isolés de l'atmosphère, le pool d'acides C4 du mésophylle

faisant écran à la pénétration du $CO_2$ externe ; seule une très faible proportion du $CO_2$ externe pourrait gagner directement les sites de synthèse du PGA correspondant environ aux 5% du $^{14}C$ total fixé retrouvés dans les composés du CRPP à l'obscurité. Il est possible d'ailleurs que les sites accessibles au $CO_2$ à l'obscurité soient localisés dans le mésophylle et devraient être distingués de ceux de la gaine qui ne peuvent être révélés que par infiltration de bicarbonate.

## C O N C L U S I O N  A U  C H A P I T R E  II B - D I S C U S S I O N.

Les résultats que nous venons de présenter, concernant le rôle joué par les acides C4 dans le déroulement de la photosynthèse C4, sont plutôt en accord avec la première hypothèse qui admet un transit obligatoire de la totalité du $CO_2$ atmosphérique dans le pool d'acides C4 du mésophylle puis la restitution du $CO_2$ au niveau de la RuDP carboxylase. Les sites de synthèse du PGA sont isolés de l'atmosphère.

Seule une fraction peu importante du $CO_2$ atmosphérique semble pouvoir gagner directement les sites de la RuDPC.

1. Les sites de la RuDPC sont isolés de l'atmosphère.

On peut expliquer cet isolement en faisant appel à des considérations d'ordre anatomique. Selon l'interprétation n° 1 du déroulement de la photosynthèse C4 (figure 1), la RuDPC serait exclusivement localisée dans la gaine. Le $CO_2$ atmosphérique serait pour partie incorporé dans les acides C4 au sein du mésophylle, ou combiné à l'eau sous forme de bicarbonate par le jeu de l'anhydrase carbonique (selon Poincelot [1972], cette enzyme serait présente dans le cytoplasme des cellules du mésophylle, chez le maïs), ou encore dissout. Le $CO_2$ serait transféré

sous ces différentes formes, jusqu'aux cellules de la gaine par diffusion [Osmond, 1971b]. L'accès direct du $CO_2$ atmosphérique aux cellules de gaine semble difficile étant donné que le mésophylle forme en apparence un manchon compact entourant la gaine (Planche 1). En fait les cellules du mésophylle ne sont pas jointives : des méats sont visibles sur une coupe longitudinale de feuilles de maïs (voir Brangeon et al. [1971] fig. 1 et Laetsch [1971]) ; une faible fraction du flux de $CO_2$ entrant dans la feuille pourrait gagner directement la gaine. Chez Digitaria sanguinalis, les espaces intercellulaires au sein du mésophylle sont beaucoup plus développés (Edwards et Black, [1971], planche 3) et ces derniers auteurs admettent que 15% du flux de $CO_2$ entrant dans la feuille peut gagner directement la gaine : ce chiffre de 15% correspond au pourcentage du $^{14}C$ total incorporé, retrouvé dans les composés du CRPP.

Ainsi il apparaît qu'une fraction du $CO_2$ atmosphérique semble pouvoir gagner les sites de la RuDPC sous une forme autre que les carboxyles des acides C4 : soit sous forme gazeuse, sous forme dissoute ou combinée (bicarbonate). Cependant la majeure partie du $CO_2$ fixé par la RuDPC (probablement plus de 90% chez le maïs, comme l'indiquent nos expériences) doit provenir de la décarboxylation des acides C4. Il est vrai que nous n'avons pu mesurer le $^{14}CO_2$ incorporé dans la feuille sous forme de bicarbonate ; Galmiche [1973a] estime la fixation de $^{14}C$ dans l'ensemble des composés labiles c'est-à-dire détruits lors de la fixation des échantillons (bicarbonate, C4 de l'oxaloacétate) à 10% ; le bicarbonate-$^{14}C$ ne doit représenter que quelques % du $^{14}C$ total incorporé dans le mésophylle (voir aussi le paragraphe suivant).

Une approche expérimentale différente a conduit Johnson et Hatch [1969] à une conclusion identique, au sujet du rôle des acides C4 comme donneurs de $CO_2$ pour la RuDPC. Les auteurs ont montré que lorsque le $^{14}CO_2$ est fourni à des feuilles en photosynthèse stationnaire (expérience de charge de 40 secondes), la quantité totale de $^{14}C$ sortant du pool d'acides C4 est égale à celle qui est fixée dans l'ensemble des composés du CRPP. Ce résultat prouve que la seule source de $CO_2$ pour la RuDPC est bien le pool (ou une fraction du pool) d'acides C4. Les mêmes auteurs ont déterminé la quantité de $^{14}C$ incorporé dans le bicarbonate, en fixant les feuilles en présence d'un mélange éthanol-potasse ; cette valeur ne représente que 5% du $^{14}C$ total fixé pendant la charge. L'alimentation de la RuDPC par le bicarbonate ne peut être que très faible.

2. Blocage du transfert du $^{14}CO_2$ vers les composés du CRPP, à l'obscurité.

Le blocage du transfert du $CO_2$ des acides C4 vers les composés du CRPP, à l'obscurité (tableau 9) peut être expliqué de différentes manières, soit par une régulation des systèmes enzymatiques intervenant dans la libération du $CO_2$ à partir des acides C4 (l'enzyme impliquée est l'enzyme malique à NADP chez le maïs), ou par une inhibition d'une translocase spécifique du malate, localisée dans l'enveloppe des plastes de gaines [Heldt et al., 1972], ou encore en envisageant une action de la lumière sur les transferts de composés dissouts au sein du mésophylle ou entre mésophylle et gaine.

L'enzyme malique (NADP), une enzyme strictement magnésium dépendante [Farineau, 1975b, figure 2] fonctionne comme décarboxylase en présence de NADP, forme oxydée. Cette activité peut être bloquée si la teneur en magnésium du stroma plastidial (des plastes de cellules de gaine) est limitante. Or cette dernière condition doit être réalisée à l'obscurité, si l'on envisage une entrée de $Mg^{++}$ dans les thylakoides [Hind et al., 1974].

La lumière pourrait aussi favoriser les échanges de composés solubles entre cellules (interprétations 1 et 2, figures 1 et 2), en accélérant les mouvements de cyclose cytoplasmique.

3. Fonctionnement de la RuDPC in vivo chez les plantes C4.

Ainsi, les conditions de fonctionnement de la RuDPC chez les plantes C4 sont très particulières du fait des difficultés d'accès du $CO_2$ atmosphérique au niveau de l'enzyme ; selon Hatch [1971a], la RuDPC n'est en relation qu'avec un pool de $CO_2$ d'importance limitée (moins de 100 nanomoles par g de poids frais) alimenté par la décarboxylation des acides C4 et dont le taux de renouvellement en photosynthèse est très élevé. La RuDPC fixerait tout le $CO_2$ initialement incorporé,

grâce à la PEPC dans les acides C4 [Wheelan et al., 1973 ; Lerman et al., 1974]. Ce serait principalement pour cette raison que la RuDPC ne peut exercer in vivo son pouvoir de discrimination vis-à-vis des isotopes lourds du carbone : $^{13}C$ ou $^{14}C$, (fournis sous forme de $CO_2$ atmosphérique) qu'elle manifeste normalement in vitro [Wheelan et al., 1970, 1973 ; Lerman et al., 1974 ; Deleens et al., 1974]. Une situation toute différente est rencontrée chez les plantes C3 où la RuDPC in situ est en relation avec un pool de $CO_2$ dont on peut considérer la taille comme infinie du fait de la facilité des échanges directs avec l'atmosphère (voir une critique de cette question, Deleens et al. [1974]) et peut discriminer entre isotopes légers et lourds du carbone [Wheelan et al., 1973]. Chez les plantes CAM, enfin, le $CO_2$ fixé par la RuDP carboxylase appartiendrait à un pool de $CO_2$ cellulaire alimenté à la fois par la décarboxylation des acides C4 et par l'atmosphère, soit une situation intermédiaire entre celle des plantes C4 et des plantes CAM [Lerman et al., 1974].

La PEP carboxylase, enzyme de carboxylation de la voie de synthèse des acides C4 jouerait donc un rôle déterminant dans le déroulement de la photosyntèse C4 puisqu'elle commanderait l'entrée du $CO_2$ dans le cycle de Calvin. En accord avec cette interprétation, il a pu être constaté que toute altération du fonctionnement de l'enzyme, par action d'inhibiteurs spécifiques comme les bisulfites* ou l'α-HPMS** [Osmond et Avahdani, 1970], ou le faible développement de l'activité enzymatique chez des plantes C4 cultivées dans des conditions défavorables [Hatch, Slack et Bull, 1969] entraîne une diminution correspondante de la fixation nette de $CO_2$ en photosynthèse, sans que la distribution du $^{14}C$ au sein des métabolites soit gravement

*GBS : glyoxal bisulfite, bisulfite de sodium
**α hydroxypyridine méthane sulfonate.

perturbée. Signalons également que, à la différence des plantes CAM [Brulfert et al., 1973], on n'a jamais mis en évidence chez les plantes C4, d'influence du photopériodisme sur l'activité de la PEP carboxylase.

# DEUXIEME PARTIE

# ETUDE DE LA PHOTOASSIMILATION DU $CO_2$ PAR DES SYSTEMES ISOLES, PLASTES OU CELLULES, DE FEUILLES DE MAIS

## INTRODUCTION

L'étude présentée dans la première partie du mémoire nous a permis de montrer à partir de nombreux faits expérimentaux, que le déroulement de la photosynthèse C4 chez le maïs implique la succession dans le temps de deux processus métaboliques distincts :

1) La fixation dans le pool d'acides C4 du mésophylle d'une majeure partie du $CO_2$ atmosphérique (90% au moins).

2) Le transfert des acides C4 vers les sites de la RuDPC, la restitution du $CO_2$ (à la suite de la décarboxylation du malate) puis son incorporation dans le PGA.

Il est nécessaire de préciser la part prise par chaque type de cellules : mésophylle et gaine, dans le déroulement de la photosynthèse C4. Nous nous limiterons au cas du maïs. Nous avons plusieurs fois signalé que deux interprétations principales s'affrontent concernant la localisation des sites de synthèse du PGA photosynthétique. Selon l'interprétation n° 3 défendue par Coombs et al. (Coombs et Baldry [1972] et voir figure 5 en Introduction), les plastes de mésophylle effectuent l'essentiel, sinon la totalité de la synthèse du PGA. Selon l'autre interprétation (n° 1, fig. 1 en Introduction) les plastes de gaine synthétisent la totalité (ou la quasitotalité : 95% au moins) du PGA puisque l'activité RuDPC s'y trouve concentrée de même

que l'activité phosphoribulokinase qui est à l'origine du RuDP. L'interprétation n° 2 est un compromis entre les deux, bien que plus proche de l'interprétation n° 1 ; on admet qu'une activité RuDPC est présente dans les plastes du mésophylle mais ne représente que 10-25% de l'activité RuDPC totale de la feuille.

Ainsi selon l'interprétation n° 3, les cellules du mésophylle peuvent mener à bien une évolution complète du cycle de Calvin. En revanche, selon les interprétations 1 et 2, les cellules de gaines synthétisent la majeure partie (ou la totalité) du PGA et la déficience d'activité réductrice des plastes ne permet pas une évolution complète du cycle de Calvin (voir la critique de cette hypothèse en Introduction) La décarboxylation du malate doit fournir aux plastes de gaine un appoint de NADPH mais il paraît nécessaire d'envisager un transfert d'une fraction du PGA formé vers le mésophylle où s'opérerait sa réduction en DHAP. L'interprétation n° 1 suppose donc un fonctionnement coopératif [Karpilov, 1970b, 74] des cellules de gaine et du mésophylle pour l'évolution de la photosynthèse C4. Les cellules de mésophylle fourniraient à la gaine, sous forme d'acides C4, à la fois le $CO_2$ et le pouvoir réducteur (NADPH) et également un substrat réduit (DHAP, [Karpilov 1970a,b]) devant permettre l'évolution du cycle de Calvin. Les cellules de gaine restitueraient au mésophylle le substrat (pyruvate ou alanine) pour la synthèse du PEP ; la fraction du PGA formé (30-40%?) ne pouvant être réduite dans la gaîne serait exportée vers le mésophylle.

Pour vérifier les propositions contenues dans les diverses interprétations, nous nous sommes efforcé d'isoler chaque type de cellules afin d'étudier leur capacité d'assimilation du $CO_2$.

CHOIX D'UNE METHODE D'ISOLEMENT DES CELLULES DE GAINE ET DE MESOPHYLLE.

a) Méthodes de broyage.

Au début de nos recherches en 1971, deux techniques d'isolement des cellules étaient connues. Dans une publication de 1970, [Woo et al., 1970] avait été décrite une technique de broyage utilisant un broyeur à palettes fournissant des préparations très pures de gaines périvasculaires ; le principe de la séparation est celui du broyage ménagé préservant les cellules à parois rigides et épaisses (celles de gaine) et détruisant les cellules fragiles (celles du mésophylle) qui éclatent et libèrent leur contenu dans le milieu. Woo et al. ont surtout utilisé cette technique pour préparer des plastes (ou fragments de plastes) de gaine, en soumettant les cellules périvasculaires à un broyage plus drastique dans une deuxième étape [Woo et al., 1970 ; Anderson et al., 1972 ; Horvath et Faludi-Daniel, 1972].

Edwards et Black [1971] se sont adressés à une autre technique ayant donné de bons résultats avec un matériel particulièrement favorable : Digitaria sanguinalis. Des cellules de mésophylle intactes (à 93%) peuvent être obtenues simplement par broyage ménagé des feuilles au mortier ; les cellules sont recueillies par filtration sur toile nylon. Des gaines purifiées sont ensuite préparées par broyage au moyen d'un homogénéiseur Ten-Broeck, puis des cellules de gaine isolées, intactes (à 70%) sont obtenues par broyage des gaines périvasculaires au mortier.

Malheureusement l'application au maïs des techniques de Edwards et Black s'est révélée impossible ; les cellules de mésophylle sont très fragiles et ne peuvent être libérées intactes par broyage ménagé ; les cellules de gaine adhèrent solidement aux vaisseaux et éclatent lors d'un broyage poussé au mortier. La technique de Woo nous a permis, en revanche, d'obtenir des préparations très pures de gaines

isolées (Planche II). Nous avons donc entrepris une étude détaillée de la capacité d'assimilation du $CO_2$ par des préparations de gaines isolées de maïs, nous limitant, en ce qui concerne le mésophylle, à tester l'activité correspondante chez les plastes de ces cellules.

Nous décrivons dans la publication n° 3 [Farineau 1975a] la technique utilisée pour l'isolement des gaines et des plastes de mésophylle ; nous avons repris la technique de Woo et al. avec quelques modifications :

1) la durée des périodes de broyage est diminuée au maximum : 1 minute en plusieurs étapes ;

2) le milieu d'isolement est tamponné à 6,8 par le MES (acide morpholino éthane sulfonique) et contient du pyrophosphate, soit un milieu proche de celui utilisé par Jensen et Bassham [1966] pour l'isolement de plastes à forte capacité de fixation du $CO_2$ ;

3) des feuilles âgées ont été choisies car elles possèdent des gaines rigides et des cellules périvasculaires peu fragiles résistant aux opérations de broyage.

Inconvénients et avantages de la méthode.

La technique d'isolement utilisant un homogénéiseur à palettes (le Waring blendor) est assez drastique : le matériel risque d'être sérieusement altéré lors du broyage; l'état des cellules de gaine, et de leurs plastes en particulier, doit être contrôlé en microscopie électronique ; on devra également, par l'utilisation de critères physiologiques, vérifier le bon état du matériel en fonctionnement photosynthétique. Des auteurs ont montré que des préparations de gaine obtenues par broyage, avec le maïs, sont manifestement en mauvais état physiologique et présentent de graves altérations à l'examen microscopique, comme la déchirure de l'enveloppe plastidiale [Chollet et Ogren, 1973]. Cependant les feuilles de maïs utilisées étaient très jeunes.

Les méthodes de broyage, en revanche, ont l'avantage de permettre l'isolement très rapide des cellules (10 minutes environ) et à basse température (2°C), ce qui doit assurer la préservation des activités physiologiques.

b) Méthodes de digestion enzymatique.

Chez le maïs, nous avons essayé sans succès d'isoler des cellules de mésophylle et de gaine par des méthodes de digestion enzymatique qui donnent d'excellents résultats avec les Dicotylédones (comme le tabac et l'épinard, [Jensen et al., 1971]) et permettent d'isoler des cellules en bon état physiologique [Farineau, 1975a]. En 1973, Kanai et Edwards ont publié une technique d'isolement des protoplastes à partir de feuilles de Monocotylédones, utilisant la cellulase à la concentration de 0,5% (poids/volume) [Kanai et Edwards, 1973]. Cette technique donne effectivement de bons résultats avec le maïs. Les gaines périvasculaires résistent à l'action enzymatique et peuvent être récupérées intactes sans contamination importante par les cellules du mésophylle.

Cette méthode n'ayant été publiée que récemment, nous n'avons pas entrepris d'étude sur les protoplastes.

La méthode de digestion enzymatique présente un inconvénient sérieux tenant à la durée des opérations d'isolement : 3-5 heures à 25°C ; le bon état des cellules obtenues dans ces conditions demande à être examiné de près ; nous avons fait quelques essais d'assimilation du $CO_2$ avec des préparations de gaines, isolées selon la méthode de Kanai et Edwards ; les résultats avec le maïs ont été très décevants, l'assimilation du $CO_2$ peu active.

Remarque :

Pour la préparation de gaines périvasculaires isolées, les deux méthodes d'isolement, broyage différentiel et digestion enzymatique ont été aussi utilisées l'une que l'autre [Usuda et al., 1974, 1975 ; Kagawa et Hatch, 1974 ; Ku et al., 1974a,b ; Gutierrez, 1974a,b ; Chollet et Ogren, 1973]. En revanche, la seule technique permettant l'isolement de protoplastes (à défaut de cellules entières) de mésophylle reste chez la plupart des plantes C4 (sauf Digitaria) la digestion enzymatique.

RESULTATS.

I. Assimilation du $CO_2$ par les plastes isolés de cellules du mésophylle (maïs).

Nous avons testé la capacité d'assimilation du $CO_2$ des plastes de mésophylle isolés selon la technique décrite dans la publication n° 3 [Farineau, 1975a], incluse dans le mémoire. Les résultats que nous avons obtenus ne faisaient que confirmer ceux obtenus par de nombreux auteurs, et ne seront donc que rapidement signalés : observation d'une faible capacité de fixation du $CO_2$ stimulée par addition de PEP ; absence d'incorporation dans les intermédiaires du cycle de Calvin (voir Introduction).

II. Photoassimilation du $CO_2$ par les cellules de gaines périvasculaires isolées du maïs.

L'étude est rapportée dans deux publications n° 3 et 4 : Physiol. Plant. 33, 1975, 300-309 et 310-316, qui ont été incluses dans le mémoire avec quelques modifications de détail.

Deux types de problèmes ont été posés, qui rejoignent tout à fait ceux qui ont été abordés dans la première partie du mémoire concernant la feuille :

1) les cellules ont-elles une capacité importante de fixation du $CO_2$ et le cycle de Calvin se déroule-t-il normalement chez les cellules illuminées et alimentées en $CO_2$ ? (Publication n° 3, [Farineau, 1975a]).

2) le malate peut-il jouer le rôle de donneur de $CO_2$ et de pouvoir réducteur, grâce à l'activité enzyme malique à NADP des cellules, pour le déroulement du cycle de Calvin ? (Publication n° 4, [Farineau, 1975b]).

 Physiol. Plant. 33: 300-309. 1975

# Photoassimilation of $CO_2$ by Isolated Bundle-Sheath Strands of *Zea mays*

## I. Stimulation of $CO_2$ Assimilation by Adding Various Intermediates of the Photosynthetic Cycle; Evidence for a Deficient Photosystem II Activity

By

JACK FARINEAU

Service de Biophysique, Département de Biologie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, B.P. n° 2, 91190 - Gif-sur-Yvette, France

(Received July 23, 1974)

Abstract

Isolated bundle-sheath (BS) strands from leaves of mature maize plants show enhanced rates of $CO_2$ fixation in the presence of reduced intermediates of the photosynthetic cycle (R5P, DHAP, FruDP . . .). 3PGA is the major labelled product of $^{14}CO_2$ fixation whatever the substrate added. $CO_2$ fixation is much lower with PGA than with reduced intermediates, suggesting a limited capacity of the cells to regenerate RuDP (the $CO_2$-acceptor) from PGA. These two experimental facts, which are characteristic features of bundle-sheath photosynthesis for maize (a species with agranal bundle-sheath chloroplasts) indicate that photosystem II activity is a limiting factor for the evolution of the bundle-sheath photosynthetic process. Nevertheless, a reducing capacity arises as proved by sensitivity of $CO_2$ fixation to DCMU, particularly when PGA is added to the bundle-sheath.

PGA synthesis occurs, in the presence of non-limiting amounts of $CO_2$, according to the equation: RuDP + $CO_2$ → 2 PGA; the oxygen effect on $^{14}CO_2$ fixation, at lower $CO_2$ concentration, is interpreted as a dilution effect of the internal pool of $^{14}CO_2$ by unlabelled $CO_2$ generated by photorespiration.

### Introduction

According to the generally accepted scheme of C4 photosynthesis (Black 1973) based upon localization of enzymatic activities in cells of C4 plant leaves, the functions of mesophyll and bundle-sheath (BS) cells would be complementary during photosynthesis. The mesophyll cells would assume, via the PEP carboxylase, the incorporation of the atmospheric $CO_2$ into C4 acids which are transported to BS cells. The latter cells would be mainly responsible for the photosynthetic assimilation of $CO_2$ which is produced from the decarboxylation of C4 acids. The application of this scheme to species possessing agranal chloroplasts in BS cells presents difficulties due to the existence of a low reducing capacity in those chloroplasts. In particular, photosystem II activities appear to be much lower in BS than in mesophyll chloroplasts (Anderson *et al.* 1971) although there is disagreement on this point (Smillie *et al.* 1972). Also, the agranal chloroplasts of maize are not able to reduce NADP in the absence of added compounds such as plastocyanin, ferredoxin and ferredoxin-NADP reductase (Smillie *et al.* 1972). Thus, it has been proposed that decarboxylation of malate, catalysed by malic enzyme, could provide the NADPH used for the reduction of 3PGA (Downton 1970); however, this hypothesis has not yet been proved. Several authors assume that the sole activity of agranal chloroplasts would be the synthesis of starch (Coombs and Baldry 1972, Laetsch 1971). On the other hand, it is generally accepted that a normal photosynthesis must occur in BS cells with granal chloroplasts.

Is the Calvin cycle operating in BS cells of maize which contain agranal chloroplasts? To answer this question we have compared photoassimilation of $CO_2$ in the latter cells with that of isolated BS cells of *Panicum texanum* and of spinach cells which both contain granal chloroplasts and should have a normal Calvin cycle process.

*Abbreviations:* PEP, Phosphoenolpyruvate; 3PGA or PGA, 3-phosphoglycerate; DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; RuDP, Ribulose-1,5-diphosphate; FruDP, Fructose-1,6-diphosphate; R5P, Ribose-5-phosphate; HEPES, N-2-hydroxy ethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid; MES, 2-(N-Morpholino)-ethane sulfonic acid; BS, Bundle-sheath.

### Material and Methods

*Zea mays* L. (cv. INRA 260) and *Panicum texanum* Buckl. were grown in a green-house in soil at 22°C, under solar illumination supplemented with artificial light

(10,000 lux, lamps HQIL Osram), between 6 a.m. and 8 p.m. Spinach was grown in fields.

*Isolation of bundle-sheath strands of cells*

Bundle-sheath strands of cells were isolated from fully expanded leaves of mature plants (for maize: 8th–11th leaf of 6–8 weeks old plants). The isolation procedure was adapted from Woo *et al.* (1970), using shortest periods of blending at full speed with the Waring-blendor. Figure 1 describes the preparation of cells yielding BS strands and containing approximately 1.5 mg of chlorophyll from 5–7 g of tissue.

*Composition of media*

*Medium A for cell isolation* consisted of 0.35 *M* sorbitol, 40 m*M* MES, 4 m*M* sodium pyrophosphate, 0.8 m*M* EDTA, 2.5 m*M* dithiothreitol, 0.5 m*M* $MgCl_2$, 0.5 m*M* $K_2HPO_4$, 2 m*M* $NaNO_3$. The pH was adjusted to 6.8 with NaOH.

*Basal medium B for incubation* consisted of 0.35 *M* sorbitol, 40 m*M* HEPES, 2.5 m*M* dithiothreitol, 7.5 m*M* $MgCl_2$, 0.5 m*M* $K_2HPO_4$, 2 m*M* $NaNO_3$. The pH was adjusted to 7.7 with NaOH. In some experiments, sorbitol concentration in medium B was 0.75 *M*.

*Preparation of cell suspensions from spinach leaves*

Cells were isolated according to the procedure of Jensen *et al.* (1971).

*Fixation of $^{14}CO_2$*

The bundle-sheath strands or isolated cells of spinach were maintained in suspension by vigorous stirring, in 5 ml of basal medium B with additives (as indicated in the caption of figures and tables), in test tubes stoppered with a rubber cap. The tubes were placed in a water bath at 28°C, and illuminated on the side with white light (21 mW × $cm^{-2}$) from a Sun-gun lamp Osram. The chlorophyll content was 10–30 $\mu g \times ml^{-1}$, determined on an aliquot in acetone water (80–20). Each experiment was performed in 2 steps; first a preincubation for 6 min in the dark with substrates and bicarbonate $^{14}C$ added and secondly, illumination for 5–10 min. When necessary, pure $N_2$ was bubbled for 5 min through the cell suspension, in darkness, before adding substrates, after which a stream of $N_2$ was maintained above the suspension. Samples of 1 ml were removed during the incubation, pipetted into 0.2 ml 2 *N* HCl, then rapidly homogenized with a Potter apparatus and frozen in liquid nitrogen. 10–20 $\mu$l aliquots of the suspending medium were mixed with 1 ml of NCS Solubilizer (Amersham) + 14 ml of toluene-PPO-POPOP, for determination of the radioactivity of the bicarbonate $^{14}C$ by scintillation counting.

*Determination of radioactivity in compounds exported out of cells* (Table 5)

Spinach cells and $C_4$ plant cells were allowed to photosynthetize for 10 min. Then, 2 samples of 1 ml were removed. In the first one, the reaction was stopped with 0.2 ml 2 *N* HCl, and the second one was centrifuged for 30 s at 500 *g*, 0.5 ml of supernatant was rapidly removed and mixed with 0.1 ml 2 *N* HCl for analysis of $^{14}C$ in the compounds.

*Separation of labelled compounds*

*Preparative separations* (particularly for PGA): Each acidified sample was placed on Whatman 3 MM paper, and

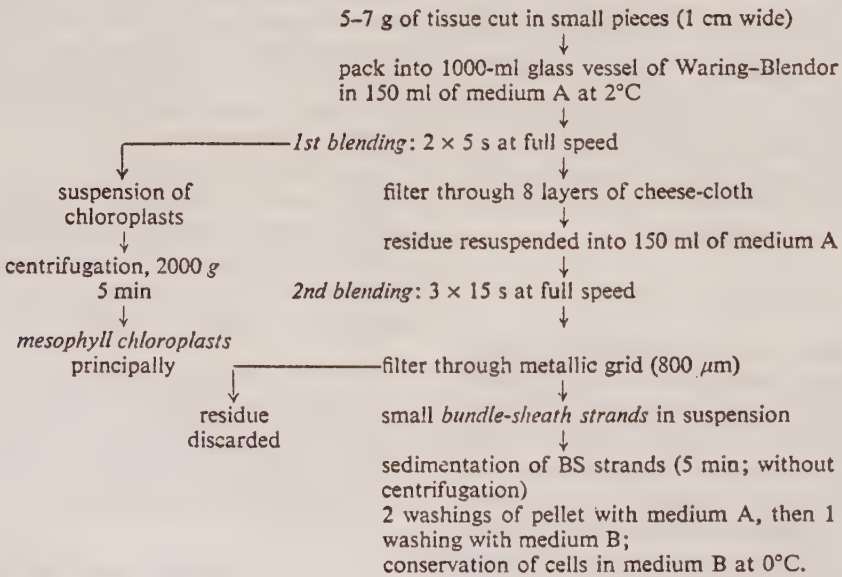



Figure 1. *Flow-chart of technique for isolating mesophyll chloroplasts and bundle-sheath strands of cells from Panicum texanum and Zea mays leaves.*

the compounds were separated by high-voltage paper electrophoresis for 1 h at pH 4.5 using as buffer: acetic acid 12 ml, pyridine 9 ml, EDTA 65 mg and water to 1 litre (Galmiche 1963). The radioactive bands, after detection by autoradiography, were eluted at 4°C with water. Aliquots were dried on planchets for determination of the radioactivity by using a flow counter. Some aliquots were also counted by scintillation counting.

*Pattern of $^{14}C$ distribution into compounds*: An aliquot of the acidified suspension of cells was kept for the analysis of compounds by a two dimensional paper electrophoresis-chromatography method (see Figure 5; Farineau 1969).

### *Enzymatic determination and degradation procedure for 3PGA*

3-phosphoglycerate was determined in eluates from preparative separations with NADH, 3PGA kinase and glyceraldehyde 3P dedydrogenase (Czok and Eckert 1962). For the degradation procedure, 3PGA was hydrolysed by potato acid phosphatase to glyceric acid; the latter was purified after treatment with Dowex 50 ($H^+$ form) by paper chromatography using as solvent the upper phase of the mixture: 1 butanol-formic acid-water (4:1:5, V/V). With added unlabelled glycerate, the glycerate $^{14}C$ was degraded by the method of Havir and Gibbs (1963) for determination of the radioactivity of the carbon atom 1, and by the method of Van Slyke *et al.* (1951) to measure the radioactivity of the 3 carbon atoms. The $^{14}CO_2$ formed in the reactions was trapped as Ba $^{14}CO_3$ in a 0.25 *N* Ba $(OH)_2$-$BaCl_2$ solution. The radioactive $BaCO_3$ was plated on sintered planchets and assayed at infinite thickness. Distribution of the radioactivity between carbon atom 1 and carbon atoms 2 + 3 was calculated from results given by the two methods; then, the radioactivity incorporated into carboxyle *deriving from* $^{14}CO_2$ was calculated by subtracting from the total radioactivity in carbon atom 1 the radioactivity deriving from carbon atom 3 of RuDP molecules (Galmiche 1973).

### *Enzymatic assays*

Enzymatic assays were performed with crude extracts of leaves and BS cells. Cell or leaf tissues were suspended in 5 ml of medium C (200 m*M* Tris pH 8.0, 2.5 m*M* dithiothreitol, 0.5 m*M* $MgCl_2$), and homogenized with the apparatus of Potter. Suspensions were filtered through a metallic grid (800 $\mu$m), and then submitted to two successive sonications of 10 s. The suspension was centrifuged at 200 *g*

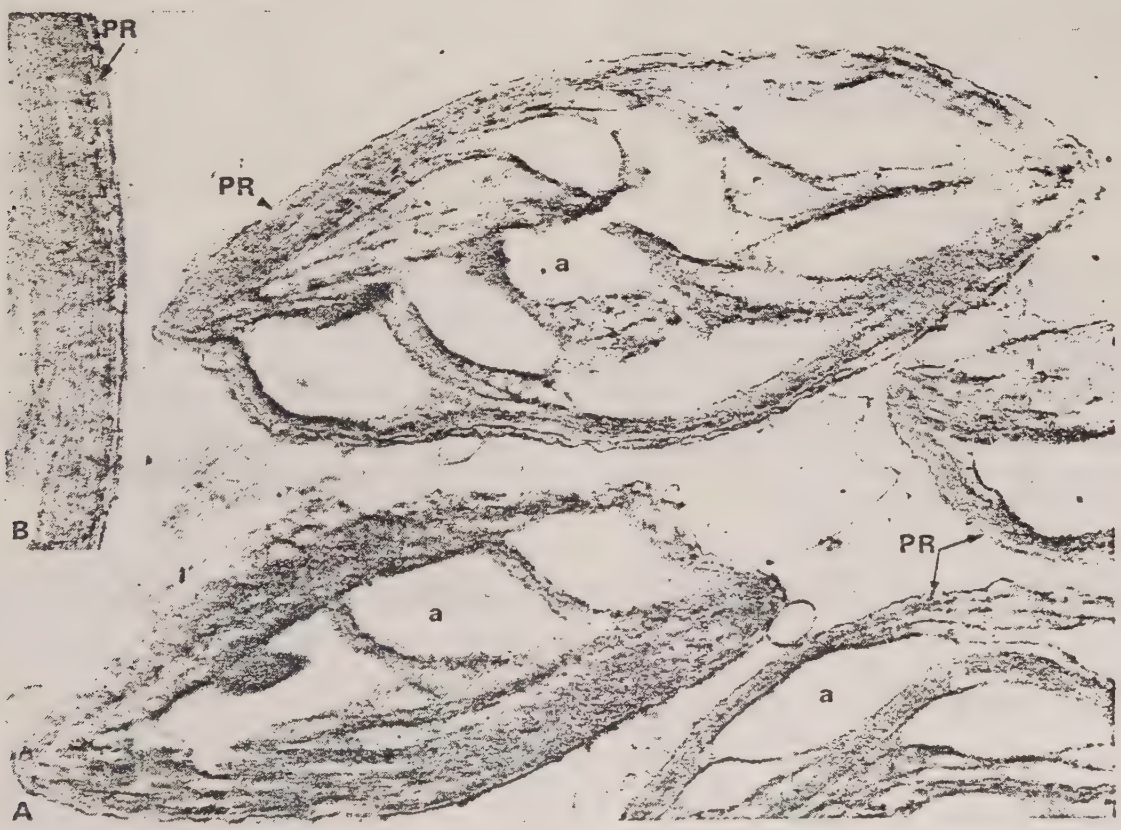



Figure 2. *Electron micrographs of sections of BS cells of Zea mays showing typical agranal chloroplasts* (A). Detail of one chloroplast (B). PR: peripheral reticulum, a: starch. (A) × 15,000.

for 5 min to eliminate residues. The chlorophyll concentration was determined on an aliquot of the supernatant. PEP carboxylase and malic enzyme were assayed by classical methods (Berry *et al.* 1970).

### *Microscopy*

All preparations of BS strands of cells were examined with a light microscope. For electron microscopy, some preparations of maize BS cells were fixed for 24 h in 2% glutaraldehyde in medium B (where 100 m*M* cacodylate buffer substituted HEPES buffer) and subsequently post-fixed in 2% $OsO_4$. The cells were dehydrated in ethanol and embedded in Araldite. Sections were post stained with uranylacetate followed by lead citrate (Reynolds 1963) and examined on a Jem T 6 electron microscope.

## Results

### *Description of the material*

Microscopic examination indicated that apparent contamination of bundle-sheath strands by mesophyll cells is negligible in maize preparations (less than 1%) and very low with Panicum (1–2%). Electron micrographs of maize BS cells (Figure 2) showed apparently intact chloroplasts, with a dense stroma and a complete external envelope. The purity of the preparations of maize BS cells was further confirmed by the high chlorophyll a/b ratios, and the low PEP carboxylase activity (Table 1). A low malic enzyme activity and a low-ratio chlorophyll a/b in BS cells of Panicum texanum clearly distinguishes those cells with granal chloroplasts from maize BS cells with agranal chloroplasts (Woo *et al.* 1970).

### *Fixation of $CO_2$*

The effect of the addition of substrates or inhibitors on $CO_2$ fixation and carbon assimilation has been reported in Tables 1 to 5 and Figures 3 and 4. The different kinds of experiments have been repeated 3–5 times with similar basic results, but the data reported in a table or figure include only one sequence of experiments performed on the same day with the same material. In this sequence, each treatment has been repeated at least twice, and the precision of the averaged results was better than 10%.

### *Effect of adding intermediates of the Calvin cycle on rates of $CO_2$ fixation*

For BS cells of maize and Panicum, the endogenous rates of $CO_2$ fixation were very low; 2–5 $\mu$mol × (mg Chl)$^{-1}$ × h$^{-1}$. Intermediates of the Calvin cycle were the only compounds which significantly enhanced the $CO_2$ fixation (Figure 3). However, in BS cells of maize the rates of $CO_2$

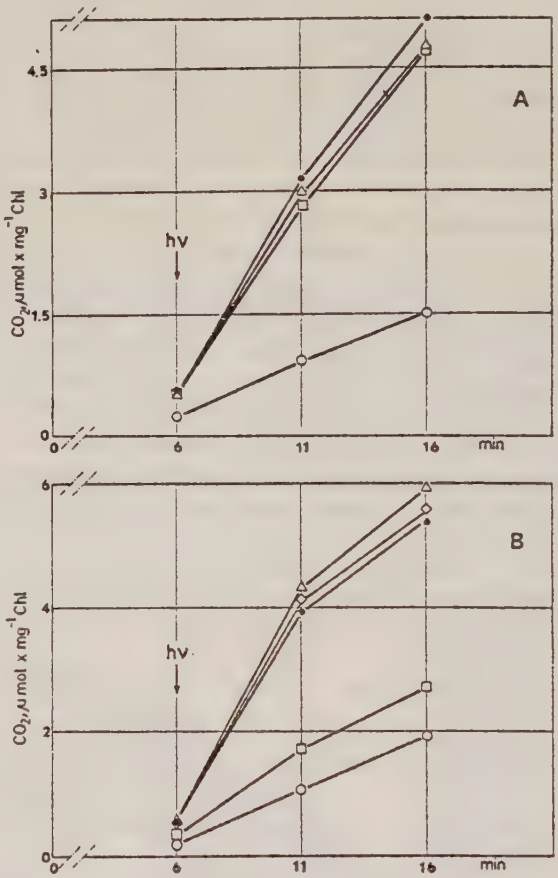



Figure 3. *The effects of added substrates on $CO_2$ photoassimilation by isolated BS cells of Panicum texanum* (A) *and Zea mays* (B). The rates of $CO_2$ fixation are calculated from total $^{14}C$ fixed (from labelled bicarbonate) into compounds. Conditions as for Table 2. All the reaction mixtures contained 0.5 m*M* NADP, 4 m*M* $NaH^{14}CO_3$ (2100 dpm × nmol$^{-1}$), in basal medium B. (○) Control (no addition), (△) 4 m*M* R5P, (◇) 4 m*M* FruDP, (●) 4 m*M* DHAP, (□) 4 m*M* PGA.

Table 1. *Chl a/Chl b ratios and activities in various fractions and total leaf of Zea mays and Panicum texanum.* The enzyme activities in crude extracts of BS cells or whole leaf are expressed as $\mu$mol of substrates transformed per h and mg of chlorophyll of extracts.

| Material | Chl a/Chl b | | PEP carboxylase | | Malic enzyme | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | BS | Mesophyll | BS | Whole leaf | BS | Whole leaf |
| *Zea mays* | 5.3 | 2.4 | 6.5 | 240 | 1330 | 410 |
| *Panicum texanum* | 2.2 | 2.4 | 3 | 385 | 227 | 63 |

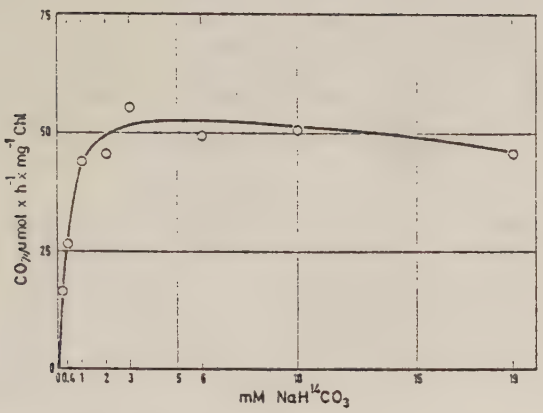



Figure 4. *The influence of bicarbonate concentration on the rates of $CO_2$ fixation in BS cells of Zea mays.* The rates of $CO_2$ incorporation were calculated from total $^{14}C$ fixed in compounds of 1 ml samples, during the first 5 min of photosynthesis. The reaction mixtures contained, besides the basal medium B, 0.5 m*M* NADP, 4 m*M* R5P, bicarbonate-$^{14}C$ (2100 dpm × $nmol^{-1}$). Anaerobic conditions.

fixation were very much lower (65%, average of 5 experiments) with added PGA than in the presence of other intermediates (R5P, DHAP, FruDP), contrary to the BS cells of Panicum. The optimal rates of $CO_2$ fixation with added substrates were 50–70 µmol × (mg Chl)$^{-1}$ × $h^{-1}$ for maize BS cells and 20–25 for Panicum.

The apparent Km for $CO_2$ fixation estimated from the concentration of bicarbonate giving approximately 50% of the maximal velocity for $CO_2$ fixation was only 0.4–0.6 m*M* with BS cells of maize (Figure 4). This value is much lower than that reported by Chollet and Ogren (1973), who have found a Km of 10 m*M* for the same material isolated from young plants. Our value is closer to those observed by Jensen *et al.* (1971) with isolated intact cells of spinach leaves. The apparent Km for $CO_2$ fixation in Panicum BS cells was always higher (2–3 m*M*).

### *Distribution of radioactivity among compounds*

Patterns of $^{14}C$ distribution among the compounds, in the case of granal species (spinach, Panicum), were very similar (Table 2). The radioactivity accumulated in the intermediates of the Calvin cycle and in the end products (starch, sugars). Nevertheless, in BS cells of Panicum, addition of substrates led to a shift of $^{14}C$ distribution towards a higher incorporation into phosphorylated intermediates (groups 1 and 2) and a decrease of labelling of the end products (group 3).

With maize BS cells, 90–95% of the label was recovered as compounds of the Calvin cycle. The striking difference from Panicum was the accumulation of radioactivity into PGA at the expense of reduced compounds (sugars, phosphate and end products) of the Calvin cycle (Figure 5).

### *Reducing capacity of BS cells of maize and $CO_2$ fixation*

*Addition of DCMU:* Results reported in Table 3 show that the rate of incorporation of label into compounds was decreased by adding DCMU, a specific inhibitor of photosystem II activity. The inhibitory effect depended upon the substrates added: a 90% inhibition with 1 µM DCMU was observed in the presence of PGA as substrate, instead of 45% with R5P added.

Table 2. *Products of $^{14}C$-bicarbonate fixation in the light, as a function of the nature of the added substrates.* Incubation with basal medium B with sorbitol 350 m*M* (for C4 plants cells) or 750 m*M* (for spinach cells), 0.5 m*M* NADP, 4 m*M* bicarbonate-$^{14}C$ (2100 dpm × $nmol^{-1}$) and other additives as indicated (4 m*M* R5P or 3PGA). Incubation under air at 25°C, illumination with white light (21 mW × $cm^{-2}$) for 5 min. The rates of $^{14}CO_2$ uptake were calculated from the amount of $^{14}C$ fixed into total compounds (µmol × (mg Chl)$^{-1}$ × $h^{-1}$). The products were separated by 2 dimensional paper electrophoresis-chromatography (see Figure 5). The radioactivity was measured directly on paper with a gas flow counter. *Compounds: Group 1:* PGA, PEP, pyruvate, glycerate (for C4 plants, PGA is 70% of total compounds of group 1 in the control, 85–90% in experiments with added substrates). *Group 2:* sugar phosphates, DHAP. *Group 3:* sugars, starch (values in parentheses), amino acids (serine, glycine, alanine). *Group 4:* C4 acids (malate, aspartate).

| Species | Treatment | Rate of $^{14}CO_2$ uptake | Distribution of $^{14}C$ into compounds % of total $^{14}C$ fixation | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Group 1 | Group 1 | Group 3 | Group 4 |
| Spinach cells | No addition | 41 | 7 | 20 | 57 | 12 |
| BS cells of *Panicum* | No addition | 4 | 21 | 12 | 38 | 27 |
| | +4 m*M* R5P | 21 | 50 | 13 | 22 (13) | 13 |
| | +4 m*M* PGA | 20 | 48 | 11 | 26 (14) | 14 |
| BS cells of *Zea* | No addition | 7 | 56 | 25 | 7 | 10 |
| | +4 m*M* R5P | 48 | 82 | 10 | 3 (1.5) | 4 |
| | +4 m*M* PGA | 19 | 81 | 9 | 2 (1) | 5 |

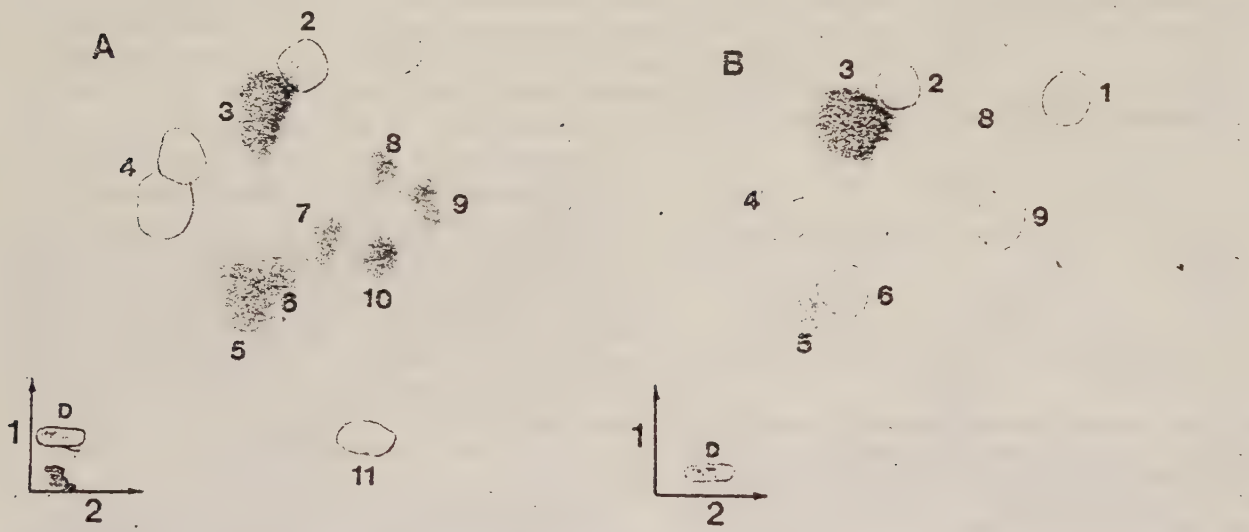



Figure 5. *The distribution of $^{14}C$ in BS cells of Zea mays and Panicum texanum after 5 min incubation with labelled bicarbonate in the light.* Fixed samples of 20–30 µl were placed on Whatman 3 MM paper for the separation of compounds by high voltage electrophoresis at pH 4.5 (direction 1). After the separation which lasted 90 min, the paper was dried, then the chromatography was performed in a perpendicular direction (direction 2) using the buffer: isobutyric acid, 100 ml — $NH_4OH$ N,60 ml — versene, 20 mg. (A) BS cells of *Panicum texanum*, (B) of *Zea mays*. Conditions and composition of assay mixtures = Table 2. Additive: 4 m*M* R5P. (1) Pyruvate, (2) PEP, (3) 3PGA, (4) sugar diphosphate, (5) glucose-6-*P*, (6) fructose-6-*P*, (7) DHAP, (8) malate, (9) glycerate, (10) aspartate, (11) saccharose, (D) start.

*Addition of NADP:* An important enhancement of the rates of $CO_2$ fixation was observed by adding NADP to the assay medium, particularly when PGA was the substrate (Table 3).

### *Permeability of cells to metabolites*

Analysis of the suspending medium of isolated BS cells during photosynthesis showed that an important fraction of the $^{14}C$ incorporated into soluble compounds diffused out of the cells, particularly with maize (Table 4). The metabolites were better retained in isolated cells of spinach, since only 12% of the soluble radioactivity was recovered in the suspending medium (as assay mixture of high osmolarity was chosen in order to prevent osmotic shocks).

Table 3. *Effects of DCMU and NADP on the total uptake of $^{14}C$ in BS cells of Zea mays.* Conditions as for Table 2. Basal medium B with 2 m*M* labelled bicarbonate and additives as indicated.

| Treatment | Rate of $^{14}CO_2$ fixation µmol × (mg Chl)$^{-1}$ × h$^{-1}$ |
|---|---|
| 2 m*M* PGA + 0.5 m*M* NADP | 14.5 |
| 2 m*M* PGA + 0.5 m*M* NADP + 1 µM DCMU | 1.5 |
| 2 m*M* PGA | 3.5 |
| 2 m*M* R5P + 0.5 m*M* NADP | 33 |
| 2 m*M* R5P + 0.5 m*M* NADP + 1 µM DCMU | 18 |
| 2 m*M* R5P | 24 |

*Origin of photosynthetic PGA; role of oxygen in PGA synthesis* (BS cells of maize)

Taking advantage of the fact that maize BS cells produce principally PGA, the major part of which is exported out of the cells, it is easy to check whether the carboxylation reaction of the photosynthetic cycle is operating or not, *i.e.* 2 molecules of 3PGA are formed from 1RuDP and 1 molecule of $CO_2$ according to the equation:

$$RuDP + {}^{14}CO_2 \rightarrow {}^{14}C1\text{-}PGA + {}^{12}C1\text{-}PGA$$

Thus, the rate of PGA synthesis would be twice that of $^{14}CO_2$ incorporation into the C1 atom of 3PGA. For this calculation the radioactivity of the C1 atom of PGA molecules was corrected for the radioactivity deriving from the C3 atom of RuDP (Galmiche 1973). The radioactivity divided by the specific radioactivity of the exogenous bicarbonate gives half the amount of PGA molecules synthetized, if we assume that there is no other source of $CO_2$. The theoretical value is compared with the experimental one determined by enzymatic assay. If there is a good agreement between the two values, then there is a good probability that the PGA is synthetized as we have proposed.

Calculated and experimental values of rates of PGA synthesis (Table 5) were in good agreement for experiments performed in the presence of high bicarbonate concentrations (more than 1 m*M*) and the rates of PGA synthesis were nearly the same in aerobic and anaerobic conditions. In

Table 4. *Diffusion of newly formed photosynthates into the suspending medium as a function of various treatments* (Spinach cells, BS cells of maize and Panicum). The $^{14}C$ content of the soluble photosynthates recovered in the suspending medium is expressed as percent of the total $^{14}C$ found in all the soluble photosynthates (inside and outside the cells). For the measurements of label exported in the suspending medium, see Methods. Conditions and calculations as for Table 2. Basal medium B with sorbitol 0.35 *M* for C4 plants cells and 0.75 *M* for spinach cells, 0.5 m*M* NADP, 4 m*M* labelled bicarbonate and additives as indicated. The rates of $CO_2$ uptake were calculated from $^{14}C$ fixed into total compounds in samples (cells + suspending medium).

| Species | Treatment | Rate of $CO_2$ uptake $\mu mol \times (mg\ Chl)^{-1} \times h^{-1}$ | $^{14}C$ into soluble photosynthates outside the cells, % |
|---|---|---|---|
| Spinach | No addition | 41 | 12 |
| *Panicum* | No addition | 4.5 | 64 |
| | +4 m*M* R5P | 21 | 75 |
| *Zea* | No addition | 7 | 86 |
| | +4 m*M* R5P | 36 | 93 |

Table 5. *Rates of PGA synthesis and $^{14}CO_2$ incorporation as a function of various treatments of BS cells of Zea mays.* Conditions and basic medium as in Table 2 + additives, 4 m*M* R5P, 0.5 m*M* NADP, bicarbonate (spec. radioactivity 2100 dpm × $nmol^{-1}$). One-ml samples were removed just before and after 5 min illumination for analysis (see Methods). In (a), the rates of $^{14}CO_2$ fixation during the light period are calculated from $^{14}C$ fixed into total compounds. In (b), the rates of $^{14}C$ fixation into PGA are given for the 3 carbon atoms of the molecule, and in parentheses are given values for the carbon atom 1 deriving from $^{14}CO_2$ (see Methods). In (c) and (d), the rates of PGA synthesis were enzymatically measured in samples (d) or calculated (c) from the values in parentheses listed in (b) (see text). In (e), the spec. radioactivity of the carbon 1 atom of PGA was calculated from values of (b) and (d) [arbitrary units]. The rates expressed as $\mu mol \times (mg\ Chl)^{-1} \times h^{-1}$.

| Treatments | | Rate of $^{14}CO_2$ fixation (a) | Rate of $^{14}C$ fixation into PGA (b) | Rate of PGA synthesis | | Spec. radioactivity of PGA (e) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Bicarbonate m*M* | Atmosphere | | | Calculated (c) | Observed (d) | |
| 6 | Air | 72 | 54 (32) | 65 | 68 | 0.48 |
| | $N_2$ | 70 | 52 (32) | 64 | 66 | 0.47 |
| 1 | Air | 45 | 33 (22) | 44 | 60 | 0.37 |
| | $N_2$ | 53 | 39 (25) | 50 | 56 | 0.45 |
| 0.5 | Air | 26 | 19 (13) | 25 | 52 | 0.24 |
| | $N_2$ | 32 | 24 (16) | 31 | 39 | 0.40 |
| 0.020 | Air | 0.7 | 0.5 (0.4) | 0.8 | 21 | |
| | $N_2$ | 1.1 | 0.8 (0.6) | 1.2 | 8 | |

contrast, the measured rates of PGA synthesis were significantly higher than the calculated ones with lower bicarbonate concentrations and the difference between the values was particularly important in aerated cells suspensions. For similar concentrations of bicarbonate, 1 m*M* or 0.5 m*M*, the measured rates were significantly higher in aerobic than in anaerobic conditions, and conversely the theoretical rates were lower under air than under nitrogen: the specific radioactivity of carbon 1 of PGA was 30–50% lower under air than under nitrogen (Table 5, col. e), but the PGA production was higher under air than nitrogen.

For very low bicarbonate concentrations (20 $\mu$M), the measured PGA synthesis was clearly higher than expected, even in anaerobic conditions. Controls in darkness have shown very low PGA synthesis: 1–5 $\mu mol \times (mg\ Chl)^{-1} \times h^{-1}$.

## Discussion

Very pure preparations of BS cells have been obtained from mature leaves of Zea mays and Panicum texanum. BS cells of Zea mays show nearly intact chloroplasts, as indicated by microscopic examination, and have a low Km for $CO_2$ fixation.

*Permeability of the membrane cells to substrates and stimulation of $CO_2$ fixation*

The illuminated BS cells possess a relatively high capacity to assimilate $CO_2$ in the presence of compounds of the Calvin cycle. With maize BS cells, synthesis of 3PGA have been demonstrated during photosynthesis (Table 5). Similar effects of stimulation of $CO_2$ fixation by adding compounds such as R5P, have been already reported for BS cells of other species, for example *Digitaria sanguinalis* (Edwards and Black 1971), *Panicum miliaceum* (Edwards and Gutierrez 1972), as well as maize (Chollet and Ogren 1973). Therefore, BS cells isolated by various methods of mechanical grinding seem to be severely depleted of substrates of the photosynthetic cycle probably due to leaching of compounds. This is in agreement with the rapid export of labelled products out of BS cells which has been observed (Table 4). A crucial point is to know whether the uptake and export of compounds in isolated cells reflect naturally occurring processes of diffusion in the whole leaf or if they are only artifacts due to alterations of cells during the isolation procedure. The latter assumption does not seem tenable as exchanges should be favoured by the existence of pores in cell-walls (Laetsch 1971) in these cells. Furthermore, in experiments performed with whole leaves of maize, autoradiography shows a very rapid appearance of photosynthetic labelled products in BS cells after a short term $^{14}CO_2$ feeding (Osmond 1971).

*Occurrence of the Calvin cycle during BS photosynthesis*

85–90% of the fixed $CO_2$ was recovered as intermediates of the Calvin cycle, sugars, starch and amino acids (Table 2). To judge from the pattern of $^{14}C$ distribution among the compounds of the BS cells of Panicum, a normal photosynthesis must occur in these cells, except for the fact that a major part of newly formed compounds are exported out of the cells. In contrast, the incorporated $^{14}C$ was recovered principally as 3PGA in BS cells of maize. This result can be explained by the occurrence of 2 phenomena: a) important exchanges; b) deficient reducing power. Exchanges were more rapid in BS cells of maize than with Panicum (Table 4). Nevertheless, the difference in the intensity of the exchanges was not high enough to explain such a shift in the labelling of compounds in maize. The last suggestion, a limiting reducing power, seems to be the determinant factor and is supported by some data concerning photosystem II activity of isolated BS chloroplasts of maize. Anderson *et al.* (1971) have shown that the Hill reaction rates of uncoupled BS chloroplasts from maize are 9–12% of uncoupled mesophyll chloroplasts, using ferricyanide as an Hill oxidant. Furthermore, the rates of non-cyclic photophosphorylation of BS chloroplasts of maize are 11–19% of that of mesophyll chloroplasts (Anderson *et al.* 1971, Arntzen *et al.* 1971), while cyclic photophosphorylation activity is similar in both chloroplasts. It seems likely that the capacity of cells to reduce PGA is low relative to their ability to produce this compound by carboxylation of RuDP (with non-limiting amounts of R5P). Only a fraction of the newly formed PGA could be reduced in the cells.

*Reducing capacity of maize BS cells and $CO_2$ fixation*

The existence of a deficient photosystem II activity in maize BS chloroplasts permits a simple explanation of the slight stimulation of $CO_2$ fixation obtained by adding PGA as compared to the stronger effects observed with reduced intermediates such as R5P or DHAP (Figure 3). Rates of $CO_2$ fixation are dependent upon rates of RuDP synthesis, resulting both from R5P production from substrates added and ATP synthesis (by cyclic and non-cyclic photophosphorylation). R5P can readily be regenerated from reduced intermediates of the Calvin cycle due to the presence of a normal enzymatic equipment in BS chloroplasts (Hatch and Kagawa 1973). In contrast, the production of R5P from PGA would be limited by the capacity of chloroplasts to reduce PGA. Furthermore, the strong inhibition of $CO_2$ fixation, observed when adding DCMU to the assay medium containing PGA (Table 3), indicates that this compound is exclusively transformed via the reducing step of the Calvin cycle. Besides, inhibition of $CO_2$ fixation by DCMU, in the presence of exogenous R5P was low (Table 3) and could be the result of an insufficient ATP supply due to inhibition of non cyclic electron transfers.

*To summarize*, BS cells of maize are able to produce NADPH allowing regeneration of RuDP via the Calvin cycle. However, photosystem II activity is a limiting factor of $CO_2$ fixation, particularly when cells are incubated with PGA as added substrate.

An unexpected stimulation of $CO_2$ fixation was observed by adding NADP to BS cells of maize, specifically in experiments with PGA (Table 3). Exogenous NADP must facilitate the utilization of intrinsic reducing capacity of chloroplasts to make NADPH. As a matter of fact, the sensitivity of $CO_2$ fixation to DCMU in the presence of PGA + NADP excluded the possibility of a NADPH production from malate by means of the malic enzyme since such an enzymatic reaction is not inhibited by 1 $\mu M$ DCMU (unpublished).

*Mechanism of PGA synthesis* (BS cells of maize)

In an assay medium containing high $CO_2$ concentration, 6 m*M* (Table 5), all the PGA molecules are formed according to the admitted stoichiometry of the photosynthetic carboxylation reaction (Galmiche 1973), that is 2 molecules of 3PGA are formed from 1 molecule of RuDP and 1 molecule of $CO_2$, the fixed $^{14}CO_2$ being exogenous undiluted

bicarbonate. With lower bicarbonate concentrations (less than 1 m*M*) the inadequacy of the previous interpretation is evident as more PGA was formed than expected from $^{14}C$ incorporation into PGA, especially under aerobic conditions. An explanation of these results could be that the internal $^{14}CO_2$ pool in cells is diluted by unlabelled $CO_2$ produced by cell metabolism. The $CO_2$ production would be particularly important in aerobic conditions due to the occurrence of photorespiration. The increase of $CO_2$ concentration and the isotopic dilution of the $^{14}CO_2$ pool could then explain the stimulation of the rates of PGA synthesis under air as compared to anaerobic conditions, and the inhibition of the rates of $^{14}CO_2$ fixation.

According to this interpretation the inhibition of the $CO_2$ fixation is apparent (due to isotopic dilution) and the true effect of oxygen is an enhancement of the carboxylation reaction, as suggested by the increased rates of PGA synthesis in an aerated medium.

Selon une autre interprétation, on peut soutenir que, en atmosphère oxygénée, du PGA est formé par oxydation du RuDP, selon une réaction catalysée par la RuDP oxygénase [Lorimer et al., 1973]. L'oxygène se comporterait comme un inhibiteur compétitif du $CO_2$ au niveau des sites de la RuDPC ; en conséquence, l'effet de l'oxygène serait, à la fois, d'inhiber la fixation du $CO_2$ sur le RuDP (réaction fournissant 2 PGA par $CO_2$ fixé) et de permettre l'oxydation du RuDP en PGA et phosphoglycolate (1 PGA formé par RuDP oxydé). Il en résulterait une inhibition effective de la fixation de $^{14}CO_2$ et donc une moindre production de PGA marqué par le $^{14}C$, ainsi qu'une production de PGA non (ou faiblement) marqué dérivant de RuDP non (ou peu) marqué. La seconde interprétation n'exclut pas la première. En effet le phosphoglycolate alimente la photorespiration et doit conduire à une production de $CO_2$ non (ou peu) marqué qui diluerait le $^{14}CO_2$ exogène, et contribuerait à augmenter la concentration locale en $CO_2$ des cellules.

At last, small amounts of PGA could be generated by other pathways, for instance from the glycolytic pathway or from DHAP (this compound deriving from other intermediates) by the function of NADP triose phosphate dehydrogenase.

I am deeply indebted to Dr. Nicole Farineau of Faculté des Sciences de Paris, for doing the electron microscopy.

I thank Dr. J. M. Galmiche for helpful discussion and for correction of the manuscript.

This work represents partial fulfilment of the requirements for a Thèse de Doctorat ès Sciences.

*Possible role of BS cells in photosynthetic processes in whole leaf* (maize)

L'activité de photoassimilation du $CO_2$ chez les cellules de gaines isolées de maïs, incubées en présence de substrats du cycle de Calvin, conduit principalement à une production de PGA. Le déroulement d'une telle activité de synthèse au sein des cellules de gaines in situ (dans la feuille) doit contribuer pour une part essentielle à l'alimentation en PGA du cycle de Calvin. Nous discuterons plus loin des modalités possibles d'un déroulement du CRPP au sein du chlorenchymata c'est-à-dire de l'ensemble tissulaire groupant les cellules de gaine et de mésophylle.

## References

Anderson, J. M., Boardman, N. K. & Spencer, D. 1971. Phosphorylation by intact bundle-sheath chloroplasts from maize. — Biochim. Biophys. Acta 245: 253–258.

Arntzen, C. J., Dilley, R. A. & Neumann, J. 1971. Localization of photophosphorylation and proton transport activities in various regions of the chloroplast lamellae. — *Ibid.* 245: 409–424.

Berry, J. A., Downton, W. J. S. & Tregunna, E. B. 1970. The photosynthetic carbon metabolism of Zea mays and Gomphrena globosa: the location of the $CO_2$ fixation and the carboxyl transfer reactions. — Can. J. Bot. 48: 777–786.

Black, C. C., Jr. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net $CO_2$ uptake. — Annu. Rev. Plant Physiol. 24: 253–286.

Chollet, R. & Ogren, W. L. 1972. Oxygen inhibits maize bundle-sheath photosynthesis. — Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 2062–2066.

— — 1973. Photosynthetic carbon metabolism in isolated maize bundle-sheath strands. — Plant Physiol. 51: 787–792.

Coombs, T. & Baldry, C. W. 1972. C4 pathway in Pennisetum purpureum. — Nat. New Biol. 238: 268–270.

Czok, R. & Eckert, L. 1962. — *In* Methoden der enzymatischen Analyse (H.U. Bergmeyer, ed.), pp. 224–228. Weinheim. Verlag Chemie G.M.B.H.

Downton, W.J.S. 1970. Preferential C4-dicarboxylic acid synthesis, the post-illumination burst, carboxyl transfer step and grana configurations in plants with C4 photosynthesis. — Can. J. Bot. 48: 1795–1800.

Edwards, G. E. & Black, C. C. 1971. Photosynthesis in mesophyll cells and bundle-sheath cells isolated from Digitaria sanguinalis (L.) Scop. leaves. — *In* Photosynthesis and Photorespiration (M. D. Hatch, C. B. Osmond and R. O. Slatyer, eds.), pp. 153–168. Wiley Interscience, New York, London, Sydney and Toronto.

& Gutierrez, M. 1972. Metabolic activities in extracts of mesophyll and bundle sheath cells of Panicum miliaceum L., in relation to the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. — Plant Physiol. 50: 728–732.

Farineau, J. 1969. Métabolisme de quelques composés phosphorylés et photophosphorylation "in vivo" chez les feuilles de Maïs. — Planta (Berl.) 85: 135–156.

– 1971. A comparative study of the activities of photosynthetic carboxylation in a C4 and a Calvin type plant (the sites of $CO_2$ fixation in C4 plants). — *In* Photosynthesis and Photorespiration (M. D. Hatch, C. B. Osmond and R. O. Slatyer, eds.), pp. 202–210. Wiley Interscience, New York, London, Sydney and Toronto.

— 1975. Photoassimilation of $CO_2$ by isolated bundle-sheath strands of Zea mays. II. Role of malate as a source of $CO_2$ and reducing power for photosynthetic activity of isolated bundle-sheath strands of Zea mays. — Physiol. Plant. 33: 310–315.

Galmiche, J. M. 1963. Influence de différentes longueurs d'onde de la lumière sur la distribution du carbone 14 dans les premiers produits de la photosynthèse en utilisant des temps d'absorption très courts du $CO_2$ par des feuilles de tomate. — *In* La Photosynthèse, Coll. Int. C.N.R.S. (C.N.R.S., ed.), pp. 589–597.

— 1973. Studies on the mechanism of glycerate 3 phosphate synthesis in tomato and maize leaves. — Plant Physiol. 51: 512–519.

Hatch, M. D. & Kagawa T. 1973. Enzymes and functional capacities of mesophyll chloroplasts from plants with C4 pathway photosynthesis. — Arch. Biochem. Biophys. 159: 842–853.

Havir, E. A. & Gibbs, M. 1963. Studies on the reductive pentose phosphate cycle in intact and reconstituted chloroplast system. — J. Biol. Chem. 238: 3183–3187.

Jensen, R. G., Francki, I. B. & Zaitlin, M. 1971. Metabolism of separated leaf cells. I. Preparation of photosynthetically active cells from Tobacco. — Plant Physiol. 48: 9–13.

Karpilov, Y. S., Malishev, O. G., Persanov, V. M. & Kusnetsova, L. G. 1974. Photosynthetic carbon metabolism of maize leaves. — *In* Photosynthesis in Maize, p. 115. (Y. S. Karpilov, ed.).

Laetsch, W. M. 1971. Chloroplasts structural relationships in leaves of C4 plants. — *In* Photosynthesis and Photorespiration (M. D. Hatch, C. B. Osmond and R. O. Slatyer, eds.), pp. 323–349. Wiley Interscience, New York, London, Sydney and Toronto.

Lorimer, J. H., Andrews, T. T. & Tolbert, N. E. 1973. Ribulose diphosphate oxygenase. II. Further proof of reaction products and mechanism of action. — Biochemistry 12: 18–23.

Osmond, C. B. 1971. Metabolite transport in C4 photosynthesis. — Aust. J. Biol. Sci. 24: 159–163.

Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. — J. Cell Biol. 17: 208–212.

Smillie, R. M., Andersen, K., Tobin, N. F., Entsch, B. & Bishop, D. G. 1972. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate photoreduction from water by agranal chloroplasts isolated from bundle sheath cells of Maize. — Plant Physiol. 49: 471–475.

Van Slyke, D. D., Plazin, T. & Weisiger, G. R. 1951. Reagents for the Van Slyke–Folcht wet carbon combustion. — J. Biol. Chem. 191: 299–304.

Woo, K. C., Anderson, J. M., Boardman, N. K., Downton, W. J. S., Osmond, C. B. & Thorne, S. W. 1970. Deficient photosystem II in agranal bundle sheath chloroplasts of C4 plants. — Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67: 18–25.

 Physiol. Plant. 33: 310–315. 1975

# Photoassimilation of $CO_2$ by Isolated Bundle-Sheath Strands of *Zea mays*

## II. Role of Malate as a Source of $CO_2$ and Reducing Power for the Photosynthetic Activity of Isolated Bundle-Sheath Cells of *Zea mays*

By

JACK FARINEAU

Service de Biophysique, Département de Biologie, Centre d'Études Nucléaires de Saclay, B.P n° 2, 91190 Gif-sur-Yvette, France

(Received July 23, 1974)

**Abstract**

The role of malate decarboxylation as a source of $CO_2$ and NADPH for the evolution of photosynthesis of isolated maize bundle-sheath strands has been investigated. The bundle-sheath cells were supplied with malate plus NADP, in the presence of intermediates of the Calvin cycle to increase the rate of $CO_2$ fixation.

The effects of malate addition on the rate of 3 phosphoglycerate synthesis, with non-saturating concentrations of bicarbonate, can be explained by an increase of the cellular pool of $CO_2$ in the cells due to malate decarboxylation. The $CO_2$ reacting with RuDP to give phosphoglycerate corresponds effectively to carbon atom 4 of malate. Malate addition produces an enhancement of the rate of $CO_2$ incorporation which is much more important when the reducing power is the limiting process for the evolution of the Calvin cycle (with phosphoglycerate as added substrate and/or in the presence of DCMU). These results demonstrate the utilization of NADPH produced by malate decarboxylation for the regeneration of RuDP. NADPH can also reverse the reaction of malate decarboxylation and gives rise to a synthesis of malate by carboxylation of pyruvate.

In contrast, the pattern of $^{14}C$ distribution among compounds is not strongly modified by malate addition. This result suggests that PGA reduction in the whole leaf must occur also in mesophyll cells to allow correct regeneration of the reduced compounds of the photosynthetic cycle.

## Introduction

Many studies based upon the localization of enzyme activities in the cells of C4 plants leaves, have shown that the two distinct pathways of C4 photosynthesis are strictly partitioned (for a recent review, Black 1973). The C4 acids are synthetized in mesophyll cells, then transported to bundle-sheath (BS) cells. It is assumed that the latter cells can perform decarboxylation of C4 acids and take up $CO_2$ for the evolution of a normal C3 photosynthesis. As BS cells with agranal chloroplasts (like maize BS cells) contain high malic enzyme activity, malate can play the role of $CO_2$ donor for BS photosynthesis (Downton 1970). Malate decarboxylation, which generates NADPH, might also be a secondary source of reducing power for the cells with a deficient photosystem II (Anderson *et al.* 1971). We have shown in a previous study (Farineau 1975) that isolated BS strands from maize and *Panicum texanum* leaves incorporate principally $^{14}C$ from $^{14}CO_2$ into compounds of the Calvin cycle. The addition of substrates such as R5P, DHAP, FruDP greatly stimulates the $CO_2$ fixation. 3 PGA is the major product of BS photosynthesis in maize (Farineau 1975), due particularly to the limited capacity of agranal chloroplasts to reduce newly formed PGA. The effect of malate addition on the photosynthetic activity of isolated maize BS strands have been investigated in two attempts, first to show the role of malate as $CO_2$ donor for BS cells (study of effects on both $CO_2$ fixation and PGA synthesis), secondly to demonstrate the role of malate as a source of reducing power for the evolution of $CO_2$ assimilation in the light.

*Abbreviations:* PEP, Phosphoenolpyruvate; 3PGA or PGA, 3-phosphoglycerate; DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; RuDP, Ribulose-1,5-diphosphate; FruDP, Fructose-1,6-diphosphate; R5P, Ribose-5-phosphate; HEPES, N-2-hydroxy ethyl piperazine-N-2-ethane sulfonic acid; MES, 2-(N-Morpholino)-ethane sulfonic acid; BS, Bundle-sheath; DTT, dithiothreitol.

## Material and Methods

### *Preparation of bundle-sheath strands*

BS strands of cells were isolated from mature leaves of 6–8 weeks old maize plants, according to a method of mechanical grinding previously described (Farineau 1975).

*Fixation of $^{14}CO_2$*

Incubation was performed in small test tubes. The cells (15 $\mu$g of chlorophyll per ml), were maintained in suspension with vigorous stirring in 5 ml of basal medium containing 330 m*M* sorbitol, 20 m*M* HEPES, 7.5 m*M* $MgCl_2$, 2 m*M* $NaNO_3$, 0.5 m*M* $K_2HPO_4$, 2.5 m*M* DTT and additives as indicated in legends of figures and tables. The pH was adjusted to 7.7. The tubes were placed in a water-bath at 28°C and illuminated on the side with white light (21 mW × $cm^2$) from a sun-gun lamp (Osram). Pure nitrogen was bubbled through the cell suspension supplemented with additives (except labelled bicarbonate or malate) for 5 min in the dark. Then, a stream of $N_2$ was maintained above the suspension and labelled substrates were added. After a period of 6 min pre-incubation in the dark with complete medium, the suspension was illuminated for 5 min. 1 ml samples were removed just before and at the end of the illumination period, and pipetted into 0.2 ml 2 *N* HCl. Samples were rapidly homogenized with a Potter apparatus and frozen in liquid nitrogen.

*Separation of compounds*

Methods for separation of compounds by paper electrophoresis (preparative separations) and 2 dimensional paper electrophoresis-chromatography (analytic separations) have been described (Farineau 1975).

*Enzymatic determination and degradation procedure for PGA*

3PGA was determined in water eluates from preparative electrophoresis with NADH, 3PGA kinase and glyceraldehyde 3-P dehydrogenase (Farineau 1975).

Repartition of label into carbon atom 1 (carboxyle) and both carbon atoms 2 + 3 was determined after degradation of the PGA molecule (Farineau 1975). Then calculation of the percentage of radioactivity into carbon atom 1 deriving from $^{14}CO_2$ was made as previously explained (Farineau 1975).

*Preparation of labelled malate*

L-malate 4-$^{14}$C and L-malate 3-$^{14}$C were prepared from the corresponding DL-aspartate 4 and 3-$^{14}$C (CEN Saclay, Dep. des Radioéléments), with NADH, aspartate amino transferase and NAD malic dehydrogenase. Both labelled malates were purified by paper electrophoresis at pH 4.5 and then by paper chromatography using as solvent the upper phase of the mixture: 1 butanol-formic acid-water, 4/1/5 (V/V).

*Enzymatic assays*

They were performed with crude extracts of BS cells (for preparation of extracts, see Farineau 1975).

PEP carboxylase, malic enzyme, NAD and NADP malic dehydrogenase were assayed by classical methods (Berry *et al.* 1970).

## Results

The effect of malate on the rates of $CO_2$ fixation and PGA synthesis in BS cells of *Zea mays* has been reported in Tables 1 to 5 and Figures 1 and 2. The different kinds of experiments have been repeated 3–5 times with similar results, but the data reported in the tables or figures are from only one sequence of experiments performed on the same day with the same material. In this sequence, each treatment has been repeated at least twice, and the precision of the averaged results was better than 10%.

*$CO_2$ fixation and PGA synthesis in the presence of added malate*

There was a noteworthy effect of malate addition on PGA synthesis under anaerobic conditions where possible intervention of respiration on malate metabolism and PGA synthesis was suppressed (Farineau 1975). When bicarbonate concentration was very low, this addition sharply enhanced the PGA production in the light (Table 1). With added malate 4-$^{14}$C, the enhancement of the rates of PGA synthesis corresponded to an important incorporation of label into PGA. In contrast, with malate 3-$^{14}$C, that

Table 1. *The effect of malate and pyruvate on the rates of PGA synthesis in isolated bundle-sheath strands of maize in the presence of limiting concentrations of bicarbonate.* The basic reaction mixture was the same as described in Methods. In addition the mixtures contained as final concentrations, where indicated, 35 $\mu$M bicarbonate (labelled or unlabelled), 4 m*M* R5P, 0.5 m*M* NADP, 4 m*M* malate (labelled on the carbon atoms 3 or 4), 1 m*M* pyruvate. Specific radioactivities were 3100 dpm × $nmol^{-1}$ for bicarbonate and 1400 dpm × $nmol^{-1}$ for labelled malate. Anaerobic conditions. The rates are expressed in $\mu$mol × (mg Chl)$^{-1}$ × $h^{-1}$. For calculations, see Methods and text.

| Treatment | Rate of PGA synthesis | Rates of $^{14}$C fixation into PGA | | Calculated rate of PGA synthesis from $^{14}$C fixed into PGA |
|---|---|---|---|---|
| | | Total label | Label in C1 | |
| R5P-NADP $^{14}$C-bicarbonate | 5.6 | 0.9 | 0.8 | 1.6 |
| R5P-NADP $^{12}$C-bicarbonate+ 3-$^{14}$C malate | 19 | 0.18 | 0.15 | 0.3 |
| R5P-NADP $^{12}$C-bicarbonate+ 4-$^{14}$C malate | 18.5 | 8.0 | 7.6 | 15.3 |
| R5P-NADP $^{14}$C-bicarbonate+ pyruvate | 6.8 | 1.1 | 0 9 | 1.8 |

enhancement was not linked with labelling by $^{14}C$ of 3PGA. If pyruvate, a product of malate decarboxylation, was added in place of malate, no supplementary PGA synthesis was observed as compared to the control.

From values of $^{14}C$ incorporation into C1 of 3PGA, we calculated an expected rate of PGA synthesis assuming that the latter compound is formed according to the equation of the photosynthetic carboxylation reaction:

$$RuDP + {}^{14}CO_2 \rightarrow PGA\text{-}1{}^{14}C + PGA\text{-}1{}^{12}C$$

It is assumed that the specific radioactivity of the $CO_2$ reacting with RuDP is the same as that of the source of $^{14}CO_2$ (malate-$^{14}C$ or bicarbonate-$^{14}C$). Thus, the rates of PGA synthesis should be equal to twice the rates of $^{14}C$ incorporation into the C1 of PGA (Farineau 1975). The calculated rate of PGA synthesis in experiments with added malate 4-$^{14}C$ was in good agreement with the observed enhancement of the rate of PGA synthesis (nearly 15 $\mu$mol $\times$ (mgChl)$^{-1}$ $\times$ h$^{-1}$), produced by malate addition. These results are consistent with the decarboxylation of the malate molecule and with the formation, from its carbon atom 4, of $CO_2$ reacting with the RuDP to give PGA, whereas the 3 other carbon atoms are not involved in the the PGA synthesis.

Addition of malate under anaerobic conditions, with half-saturating concentrations of bicarbonate-$^{14}C$, provoked a 20% decrease of the total incorporation of $^{14}C$ as compared to the control (Table 2). $^{14}C$ incorporation into PGA was also lower, but the rates of PGA synthesis enzymatically determined were increased so that the PGA formed with malate had a lower specific radioactivity than that formed in its absence. Added pyruvate had no effect on $^{14}C$ fixation or PGA synthesis. From the values of $^{14}C$ incorporation into carbon atom 1 of PGA, we calculated the expected rates of PGA synthesis as explained previously, assuming that the specific radioactivity of the $CO_2$ reacting with RuDP was the same as that of the added bicarbonate (Table 2). Calculated rates of PGA synthesis (col. d, Table 2) were much lower than the observed rates (col. e, Table 2) in experiments with malate. Conversely, in the control the difference between the calculated and observed values was low as previously observed in experiments (Table 1) — nearly 5 $\mu$mol $\times$ (mgChl)$^{-1}$ $\times$ h$^{-1}$ (see also discussion in Farineau 1975), The results of Table 2 are consistent with the decarboxylation of the malate molecule leading to an isotopic dilution of added $^{14}CO_2$ in cells by unlabelled $CO_2$ from malate, and to an increase of the concentration of $CO_2$ in cells. So we observed a decrease of the $^{14}C$ incorporation into PGA (due to isotopic dilution) and an increase of the PGA synthesis caused by the increase of the $CO_2$ concentration. In the experiments reported in Table 2, the factor of dilution of the $^{14}CO_2$ pool is nearly 40% (col. f, Table 2).

### *Inhibition of $CO_2$ fixation by DCMU and release of inhibition by malate addition*

Malate addition released the DCMU inhibition of the $^{14}CO_2$ fixation (Table 3). This effect was more striking with PGA as added substrate, the inhibition by DCMU being almost complete, than with ribose-5-phosphate, in which case DCMU inhibited the $^{14}CO_2$ uptake less.

Rates of $^{14}CO_2$ fixation were 6 times larger when malate was added to DCMU-treated cells, incubated with PGA. By taking into account the isotopic dilution of $^{14}CO_2$, true rates of $CO_2$ fixation were indeed 40% higher. As a matter of fact a 10-fold stimulation of rates of $CO_2$ fixation was observed by adding malate to DCMU-treated cells, incubated with PGA, as compared to 1.8 with untreated cells (Table 3).

### *Distribution of radioactivity into different compounds in the presence of malate*

1) Addition of malate to the assay medium containing PGA as substrate and labelled bicarbonate led to a slight,

Table 2. *The effect of malate and pyruvate on the rates of PGA synthesis in the presence of half-saturating concentrations of bicarbonate.* In addition to basic medium the mixtures contained, where indicated, 0.5 m*M* labelled bicarbonate (3100 dpm $\times$ nmol$^{-1}$), 2 m*M* R5P, 0.5 m*M* NADP, 1 m*M* pyruvate, 4 m*M* malate. Rates in $\mu$mol $\times$ (mg Chl)$^{-1}$ $\times$ h$^{-1}$. In (f) the specific radioactivity of the carbon atom 1 of PGA was calculated from results given in (c) and (e). For other calculations, see Methods and text.

| Treatment | Rate of $^{14}C$ fixation (total compounds) | Rate of $^{14}C$ fixation into PGA | | Rate of PGA synthesis | | Specific radioactivity of PGA |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Total label | Label in C1 | Calculated | Observed | |
| | (a) | (b) | (c) | (d) | (e) | (f) |
| R5P-NADP | 27.5 | 22.4 | 13.4 | 26.7 | 32.6 | 0.42 |
| R5P-NADP malate | 22.5 | 17.5 | 10.6 | 21.2 | 45 | 0.24 |
| R5P-NADP pyruvate | 27.5 | 22 | 13.1 | 26.2 | 34 | 0.39 |

Table 3. *Effect of DCMU on the rates of $^{14}CO_2$ fixation* ($\mu$mol × (mgChl)$^{-1}$ × h$^{-1}$) *and release of the inhibition by malate addition.* In addition to basic medium, the mixtures contained, where indicated, 0.5 m*M* labelled bicarbonate (3100 dpm × nmol$^{-1}$), 0.5 m*M* NADP, 4 m*M* PGA or R5P, 4 m*M* malate, 1 $\mu$M DCMU. The rates of $^{14}CO_2$ fixation, *i.e.* apparent rates of $CO_2$ fixation, were calculated from total $^{14}C$ incorporated, and for experiments with DCMU also as per cent of that of the control. The values in parentheses, which represent true rates of $CO_2$ fixation, were calculated from apparent values by taking into account the 40% dilution of $^{14}CO_2$ by $^{12}CO_2$ deriving from malate decarboxylation (Table 2).

| Treatment | Control | DCMU | |
|---|---|---|---|
| | | $\mu$mol × (mgChl$^{-1}$) × h$^{-1}$ | % of control |
| PGA-NADP | 19 | 1.8 | 9.5 |
| PGA-NADP + malate | 21 (35) | 11.5 (19) | 54 |
| R5P-NADP | 42 | 23 | 54 |
| R5P-NADP + malate | 34 (56) | 30 (50) | 88 |

but significant increase of the labelling of reduced compounds of the photosynthetic cycle (Group 2) at the expense of PGA (Table 4). However, with added ribose-5-phosphate, in most experiments, malate had no effect on $^{14}C$ distribution into Calvin cycle compounds.

2) Labelling of malate with $^{14}C$ from $^{14}C$-bicarbonate was strongly increased when malate was added to the incubation medium containing ribose-5-phosphate and NADP (cf. Figure 1, exp. 2 with a complete medium and exp. 5 without malate). The labelling of malate was still more important when pyruvate was added in the absence of R5P (exp. 1 with a complete medium, Figure 1). In this experiment, it was clear that the light had no marked effect on the rate of malate labelling. Such a result suggests that the enhancement of the malate labelling due to malate addition, does not involve photosynthesis, *i.e.* labelled malate molecules would not be the end products of a photosynthetic process. In agreement with this assumption, we can observe that the malate labelling was not directly related to $^{14}C$ incorporation into photosynthetic compounds

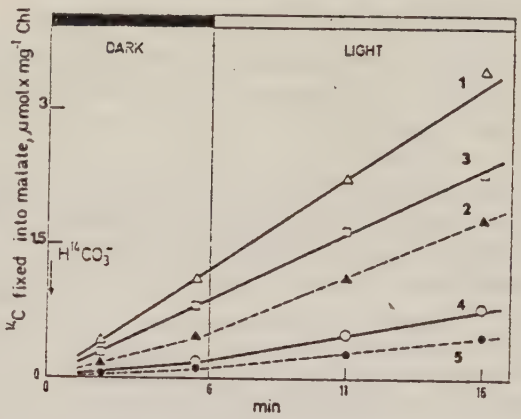



Figure 1. *Incorporation of $^{14}C$ from labelled bicarbonate into malate in isolated BS cells of maize, in the dark and in the light.* Conditions and basic medium = Table 1 and in Methods. In addition, the mixtures contained, where indicated, 4 m*M* bicarbonate, 0.5 m*M* NADP, 4 m*M* ribose-5-phosphate or pyruvate, 4 m*M* malate. All the mixtures contained 7.5 m*M* $MgCl_2$. Curves: (1) △: Pyruvate, bicarbonate, malate, NADP (complete); (2) ▲: R5P, bicarbonate, malate, NADP (complete); (3) □: pyruvate, bicarbonate, malate (NADP omitted); (4) ○: pyruvate, bicarbonate, NADP (malate omitted). (5) ●: R5P, bicarbonate, NADP (malate omitted). $NaH^{14}CO_2$ was added to the suspension in darkness at time 0. The light was turned on at time 6 min. 0.5 ml samples were removed at various times as indicated. Malate radioactivity was referred to BS cells containing 1 mg chlorophyll.

(intermediates and sugars) as shown by Table 5, exp. 1 and 2 (the incorporation into photosynthetic compounds was three times higher with added R5P than with pyruvate, whereas the malate labelling was two times higher with the latter than with the former). The malate labelling could involve an exchange reaction between the carboxyle of this compound and labelled bicarbonate, in the presence of pyruvate and NADP (the malate labelling was lower in the absence of NADP, exp. 3 of Figure 1). The exchange was evidenced by the same kinetic of the labelling of malate with a crude extract of BS cells (Figure 2) as with the whole leaf (Figure 1). The reactions with crude extracts were strictly NADP and magnesium dependent (Figure 2). It seems likely that the malate labelling involves the

Table 4. *Distribution of the $^{14}C$ among the different compounds formed during photosynthesis.* Conditions and media as for Table 3. The techniques for the isolation of compounds and counting see Farineau (1975). *Group* 1: PGA, PEP, pyruvate, glycerate (PGA contained 80–90% of total group 1); *Group* 2: sugars phosphate, DHAP; *Group* 3: end products, sugars, starch (values in parentheses), amino acids; *Group* 4: C4 acids (malate contained 90–95% of radioactivity of total group 4). Ratios = radioactivities found in group 1 to that of group 2, in the case of the experiment. Average of values for 3 different experiments given in parenthesis.

| Treatment | Radioactivity of the different types of compounds, % of the total radioactivity | | | | Ratios group 1/group 2 |
|---|---|---|---|---|---|
| | Group 1 | Group 2 | Group 3 | Group 4 | |
| PGA-NADP | 85 | 7 | 1.2 (0.25) | 6 | 12.1 (11.8) |
| PGA-NADP + malate | 78 | 9 | 1.6 (0.7) | 11 | 8.6 (8.3) |
| R5P-NADP | 85 | 10 | 1.3 (0.4) | 3.5 | 8.5 (8.6) |
| R5P-NADP + malate | 77 | 9 | 1.5 (0.5) | 12 | 8.6 (8.4) |

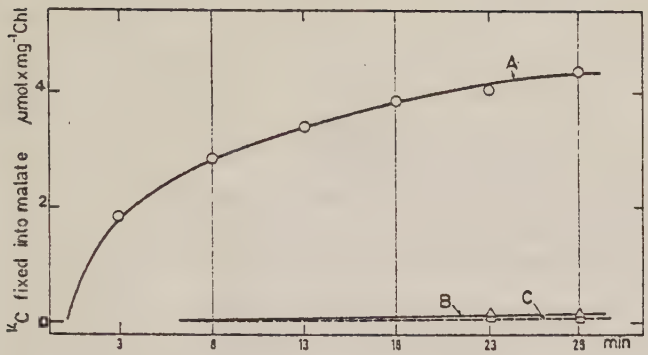



Figure 2. *Incorporation of $^{14}C$ from labelled bicarbonate into malate in crude extracts of BS cells of maize, in the dark.* The reaction mixture (3 ml) consisted of 0.5 ml of crude extracts of BS cells with 25 µg of chlorophyll, 200 m*M* Tris, 4 m*M* pyruvate, 4 m*M* bicarbonate, 4 m*M* malate, spec. radioactivity of bicarbonate: 3000 dpm × nmol$^{-1}$. In addition the mixtures contained 0.5 m*M* NADP and 7.5 m*M* $MgCl_2$ (Exp. A), 0.5 m*M* NADP and 1 m*M* EDTA (Exp. B); Exp. C was similar to Exp. A but NADP was omitted. The pH was adjusted to 8.0 and the temperature was 28°C. The incubation was performed in rubber stoppered test tubes. The malate was separated by paper electrophoresis, its radioactivity determined and referred to a volume of extract with 1 mg chlorophyll. Enzyme activities in crude extracts (µmol of substrate transformed per h and mg of chlorophyll of extracts) were malic enzyme 1420, NADP malic dehydrogenase 11, NAD malic dehydrogenase 3540, PEP carboxylase 7. Malic enzyme exhibited a strict requirement for $MgCl_2$; no activity was found in the absence of this compound.

malic enzyme as the activity of this enzyme was very high in extracts and showed the same requirements for magnesium and NADP (legend of the Figure 2). The labelled malate would be formed by the reductive carboxylation of pyruvate (Equation (1)), the NADPH being a product of malate decarboxylation (Equation (2));

$$^{14}CO_2 + \text{pyruvate} + \text{NADPH} \rightarrow \text{Malate-}^{14}C + \text{NADP} \quad (1)$$

$$\text{Malate} + \text{NADP} \rightarrow \text{Pyruvate} + CO_2 + \text{NADPH} \quad (2)$$

$$^{14}CO_2 + \text{Malate} \rightarrow \text{Malate-}^{14}C + CO_2$$

With R5P as added substrate, pyruvate could be produced by transformation of intermediates of the Calvin cycle and particularly PGA.

## Discussion

We have shown that the C4 of malate, after decarboxylation of the molecule, is used as a carbon source for the carboxylation of ribulose-1,5-diphosphate in BS cells of maize and moves to the carbon atom 1 of PGA. That is consistent with the recent data of Dittrich *et al.* (1973) concerning BS cells of *Digitaria sanguinalis* fed with malate 4-$^{14}C$. On the other hand, we can conclude, that malate decarboxylation leads to a reduction of NADP. This formation of reducing power is evidenced by the release of the DCMU inhibition of the $CO_2$ uptake and the enhancement of $^{14}C$ incorporation from $^{14}CO_2$ into reduced compounds of the Calvin cycle. Direct production of NADPH by feeding BS cells of various C4 species with malate + NADP have been already shown by Huber *et al.* (1973). Moreover, according to our interpretation, the existence of a coupling between malic enzyme activity and the reductive step of the Calvin cycle is demonstrated.

The release of the inhibitory effect of DCMU on $CO_2$ fixation by adding malate is particularly striking with PGA as added substrate, that is in experimental conditions where photosystem II activity (and so, reduction of PGA) is the limiting process for the regeneration of the $CO_2$-acceptor, RuDP, from exogenous intermediates (Farineau 1975). We have verified that addition of malate to isolated chloroplasts devoid of malic enzyme activity (spinach chloroplasts) has no effect on the inhibition of NADP reduction by DCMU. Therefore, it is unlikely that malate could eliminate DCMU by forming a complex with it. Accumulation of $^{14}C$ into PGA is mainly due to the existence of a deficiency of reducing power permitting the reduction of only a small fraction of labelled PGA (Farineau 1975).

Table 5. *Rates of $^{14}C$ incorporation into various compounds.* The rates are calculated from the $^{14}C$ incorporated during 5 min incubation in the light. The experiments are those reported in Figure 1. For details, see Figure 1.

| Treatment | Rates of $^{14}C$ incorporation µmol × (mg Chl)$^{-1}$ × h$^{-1}$ | | |
|---|---|---|---|
| | Into total compounds | Into phosphorylated intermediates and sugars | Into malate |
| Experiment 1<br>Pyruvate, malate, NADP | 29 | 17 | 12 |
| Experiment 2<br>R5P, malate, NADP | 56 | 50 | 6 |
| Experiment 4<br>Pyruvate, NADP | 21 | 18 | 3 |
| Experiment 5<br>R5P, NADP | 58 | 57 | 1.5 |

Malate addition to cells increases the rates of PGA reduction by supplying the NADP triose dehydrogenase with the NADPH produced concomitantly by malate decarboxylation. Consequently, the labelling of reduced compounds becomes larger at the expense of that of PGA.

We have shown that NADPH can also be used for reductive carboxylation of pyruvate leading to an exchange reaction between the $CO_2$ and the carbon atom 4 of malate. This reaction is light insensitive and is depending upon malic enzyme activity.

## Conclusions

The malic enzyme plays a key role in all the reactions discussed here. By its action malate is decarboxylated in BS cells and gives rise to a production of $CO_2$ and NADPH. This $CO_2$ increases the internal $CO_2$ pool. NADPH can be used both to reduce PGA generated by carboxylation of RuDP in the light, and to reverse malate decarboxylation. Nevertheless, the amount of NADPH generated by decarboxylation of malate is insufficient to permit reduction of the PGA which could be formed by fixation of $CO_2$ from malate decarboxylation as 1 NADPH is generated per $CO_2$ and 1 $CO_2$ can give 2PGA. Therefore, 50% of the PGA molecules formed after malate addition cannot be reduced. In consequence, the supplementary production of PGA and reduced intermediates by adding malate cannot modify dramatically the pattern of $^{14}C$ distribution into compounds as observed in Table 4.

L'augmentation du marquage des composés réduits du CRPP (en valeur relative), après addition de malate, est tout de même assez faible ; il est possible que les plastes aient été légèrement altérés au cours de l'isolement des cellules et qu'une structure labile assurant le couplage entre décarboxylation du malate et réduction du PGA ait été partiellement détruite.

### References


Anderson, J. M., Boardman, N. K. & Spencer, D. 1971. Phosphorylation by intact bundle-sheath chloroplasts from maize. — Biochim. Biophys. Acta 245: 253–258.

Berry, J. A., Downton, W. J. S. & Tregunna, E. B. 1970. The photosynthetic carbon metabolism of Zea mays and Gomphrena globosa: the location of $CO_2$ fixation and the carboxyl transfer reaction. — Can. J. Bot. 48: 777–786.

Black, C. C., Jr. 1973. Photosynthetic carbon fixation in relation to net $CO_2$ uptake. — Annu. Rev. Plant Physiol. 24: 253–286.

Dittrich, P., Salin, M. L. & Black, C. C. 1973. Conversion of carbon 4 of malate into products of the pentose cycle by isolated bundle-sheath strands of Digitaria sanguinalis (L.) Scop. leaves. — Biochem. Biophys. Res. Commun. 55: 104–110.

Downton, W. J. S. 1970. Preferential C4-dicarboxylic acid synthesis, the post illumination burst, carboxyl transfer step and grana configurations in plants with C4 photosynthesis. — Can. J. Bot. 48: 1795–1800.

Farineau, J. 1975. Photoassimilation of $CO_2$ by isolated bundle-sheath strands of Zea mays. I. Stimulation of $CO_2$ assimilation by adding various intermediates of the photosynthetic cycle; evidence for a deficient photosystem II activity. — Physiol. Plant. 33: 300–309.

Galmiche, J. M. 1973. Studies on the mechanism of glycerate 3 phosphate synthesis in tomato and maize leaves. — Plant Physiol. 51: 512–519.

Hatch, M. D. & Kagawa, T. 1973. Enzymes and functional capacities of mesophyll chloroplasts from plants with C4 pathway photosynthesis. — Arch. Biochem. Biophys. 159: 842–853.

Huber, S. C., Kanai, R. & Edwards, G. E. 1973. Decarboxylation of malate by isolated bundle-sheath cells of certain plants having the C4-dicarboxylic acid cycle of photosynthesis. — Planta (Berl.) 113: 53–66.

Karpilov, Y. S., Malishev, O. G., Persanov, V. M., & Kusnetsova, L. G. 1974. Photosynthetic carbon metabolism of maize leaves. — *In* Photosynthesis in Maize (Y. S. Karpilov, ed.), p. 115.

DISCUSSION ET CONCLUSION A LA DEUXIEME PARTIE.

1. Capacité d'assimilation du $CO_2$ des cellules de gaine (maïs).

Les cellules de gaine périvasculaire de maïs assimilent le $^{14}C$ du $^{14}CO_2$, à la lumière, presque exclusivement dans les composés du CRPP - et principalement dans le PGA ; en revanche le marquage du malate est très faible, sauf pour les expériences où ce composé est ajouté au milieu d'incubation. Des vitesses élevées de fixation du $CO_2$ (plus de 50 µmoles par mg Chl et par heure) ne sont observées que si l'on fournit aux cellules des substrats réduits du CRPP comme le ribose 5 phosphate ou le DHAP; dans ces conditions expérimentales, l'inhibition de la fixation du $CO_2$ par action de la DCMU est peu importante. Le PGA ajouté en tant que substrat stimule faiblement la fixation du $CO_2$ ; en présence de ce composé, la DCMU inhibe alors très fortement l'incorporation du $CO_2$. Nous avons interprété ces faits de la façon suivante le déroulement du cycle de Calvin est possible dans les cellules à capacité réductrice limitée de la gaine à condition de fournir aux cellules des substrats réduits qui permettent la régénération de l'accepteur de $CO_2$ du cycle de Calvin, le RuDP - le déroulement de ce processus détermine en effet la capacité d'assimilation du $CO_2$ par les cellules [Bassham, 1971]. Le PGA, principal produit synthétisé par fixation du $CO_2$ ne peut être transformé activement par les cellules. Ce résultat a été confirmé récemment par Usuda et al. [1975] qui ont montré que des cellules de gaine de maïs (préparées par digestion enzymatique ) réduisent beaucoup moins activement le PGA-$^{14}C$ fourni aux cellules, que les cellules de gaines isolées de feuilles de millet - rappelons que chez cette dernière espèce C4, les cellules de gaine renferment des plastes granaires à activité normale du PS II (plante C4 du groupe 3).

2. Rôle du malate dans l'évolution de la photosynthèse des cellules de gaine chez le maïs.

Le malate, ajouté au milieu d'incubation des cellules de gaine maintenues en anaérobiose, assure une alimentation en $CO_2$ équivalente à une concentration en bicarbonate de 0,3-0,4 mM, si l'on en juge par la valeur de la vitesse de synthèse du PGA à la lumière (tableau 1, pub. n° 4 : milieu très pauvre en bicarbonate) ou par la dilution isotopique du bicarbonate-$^{14}C$ fourni aux cellules par le malate non marqué (tableau 2, pub. n° 4).

En présence de malate + NADP exogènes, l'utilisation du NADPH provenant de la décarboxylation du malate permet à la cellule de réduire une partie du PGA synthétisé, particulièrement chez les cellules traitées par la DCMU (tableau 3, pub. n° 4) ; l'effet de cet inhibiteur du photosystème II démontre par ailleurs que l'activité de synthèse du NADPH des plastes in situ est non nulle, alors que les plastes isolés ne peuvent réduire le NADP exogène qu'en présence de plastocyanine (+ ferredoxine et ferredoxine-NADP réductase) [Bishop, 1974].

Ces faits sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle le système malate-enzyme malique à NADP peut assurer à la cellule de gaine l'essentiel de son approvisionnement en $CO_2$ et fournir un appoint de pouvoir réducteur (voir interprétations 1 et 2, figs 1 et 2, Introduction).

3. Critique des expériences ; signification des phénomènes d'échanges : réalité ou artefact .

L'obtention de préparations de gaines périvasculaires exemptes de contaminations nécessite l'emploi de méthodes de broyage assez drastiques qui pourraient provoquer l'altération des structures cellulaires ; on peut tenir pour une confirmation de cette hypothèse le fait que les cellules de gaine manifestent une perméabilité particulièrement

importante aux métabolites et cofacteurs. En effet, des vitesses élevées de fixation du $CO_2$ ne sont observées qu'en présence de R5P et DHAP (tableau 2 et figure 3, pub. n° 3). Ces intermédiaires du CRPP sont métabolisés dans les plastes des cellules de gaine : en effet leur entrée dans les plastes est accompagnée par une sortie massive de métabolites solubles marqués par le $^{14}C$ (tableau 4 pub. n° 3) ; un flux sortant de composés photosynthétiques marqués est également observé en l'absence de substrats exogènes ( tableau 4,pub.n°3).

Enfin des cofacteurs comme le NADP (tableau 3, pub. n° 3) et l'ADP (résultats non présentés), ajoutés dans le milieu d'incubation, stimulent la fixation de $CO_2$.

Ces échanges sont-ils particuliers aux cellules de gaines isolées de maïs ou bien peuvent-ils être observés avec des cellules de gaines isolées appartenant à d'autres espèces C4, ou même chez des cellules isolées de feuilles de plantes C3 ?

- Chez les cellules isolées de feuilles d'épinard, préparées par macération en milieu hypertonique, la diffusion des métabolites hors des cellules pendant l'activité photosynthétique est très faible (5-10% du $^{14}C$ fixé dans les composés solubles:Annexe;Jensen et al [1971]). Cependant lorsque les cellules sont isolées par broyage en milieu isotonique, la diffusion des métabolites solubles est nettement plus importante : 25% [Kulandaivelu et Gnanam, 1974].

- Les échanges de métabolites ont été observés au cours de l'activité photosynthétique chez les cellules de gaines isolées de nombreuses espèces de plantes C4. Considérons pour commencer le cas des plantes C4 du groupe 1 (voir tableau 1 en Introduction).

Edwards et Black [1971] ont mis en évidence chez les cellules isolées de gaines de Digitaria sanguinalis (par broyage) une stimulation importante de la fixation du $^{14}CO_2$ à la lumière, par addition

de substrats (R5P, RuDP) et cofacteurs (ADP). Huber et al [1973] ont montré que les cellules isolées de gaines chez de nombreuses espèces C4, réduisent le NADP lorsqu'elles sont incubées en présence de ce composé et de malate, et rejettent le NADPH produit dans le milieu d'incubation ; si l'on admet que le NADPH provient de la décarboxylation au malate catalysée par l'enzyme malique des plastes, on est conduit à admettre l'entrée du NADP dans les organites.

Chez les plantes C4 des groupes 2 et 3, nous avons montré que chez Panicum texanum (groupe 2) une proportion notable (50-70 %), mais plus faible que chez le maïs, des composés solubles synthétisés par les cellules de gaine, est évacuée dans le milieu d'incubation. En revanche, les cellules de gaines isolées d'Atriplex spongiosa (groupe 3) préparées par broyage, n'exportent que 40-45 % des composés synthétisés solubles dans le milieu d'incubation et ne montrent qu'une très faible stimulation de la fixation de $^{14}CO_2$ par addition de substrats - cependant la vitesse de fixation du $CO_2$ par les cellules est intense (40-120 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$) (voir Annexe ; [Kagawa et Hatch, 1974]).

Pour conclure, il apparaît clairement que la perméabilité des cellules aux métabolites est un phénomène général, observé aussi bien avec les cellules isolées de plantes C3 qu'avec les gaines isolées de plantes C4 ; cependant les cellules doivent avoir été préparées par broyage mécanique (voir aussi plus loin). Chez les cellules de gaines la stimulation de la fixation du $^{14}CO_2$ par addition de substrat n'est observable que dans le cas où les cellules manifestent une forte perméabilité aux métabolites (cas du maïs et de plantes des groupes 1 et 2, tableau 4, pub. n° 3). L'addition de composés exogènes serait nécessaire précisément pour compenser les pertes de substrat par diffusion. On peut envisager que les plantes du groupe 1 ont des <u>échanges intercellulaires beaucoup plus actifs</u> que celles des autres groupes.

Nous avions déjà émis cette hypothèse pour expliquer les modalités du marquage par le $^{14}C$ des composés du CRPP chez les plantes C4 des divers groupes (Farineau [1971], comparaison entre maïs et Amaranthus).

Les échanges intercellulaires observés in vitro reflètent-ils des phénomènes se déroulant normalement au sein de la feuille et dont l'importance physiologique serait à préciser ? ou bien sont-ils uniquement des artefacts occasionnés par la détérioration des structures cellulaires ?

Les cellules ont-elles été altérées lors de leur isolement ?

On peut expliquer de façon simple l'existence de phénomènes d'échanges entre gaine et milieu extérieur in vitro par le fait que le contenu cellulaire (cytoplasme) est au contact direct de l'extérieur au niveau des plasmodesmes, sans interposition d'une barrière membranaire ; les cellules, de ce fait, s'appauvrissent en métabolites dès leur isolement. Il n'est pas nécessaire de supposer l'existence de déchirures des parois cellulaires mais de telles altérations structurales contribueraient évidemment à accroître l'intensité des échanges. En revanche, la perméabilité des membranes plastidiales de maïs (et d'autres plantes du groupe 1, voir Huber et al. [1973]) à des cofacteurs réputés non échangeables comme le NADP ou l'ADP (Heber [1974] études faites sur l'épinard), pose un problème sérieux. Les membranes plastidiales pourraient avoir été détériorées au cours de l'isolement des organites, bien que, dans le cas de nos expériences, les plastes semblent posséder une enveloppe intacte (figure 1, pub. n° 3, microscopie électronique). On devrait alors admettre que, au moins chez les plantes C4 du groupe 1, les plastes sont détériorés à l'intérieur même de cellules apparemment intactes, au cours de l'isolement de celles-ci. Il serait nécessaire pour clarifier ce point, d'étudier les propriétés de perméabilité de plastes de gaines, isolés en bon état structural.

Nécessité physiologique des échanges.

La nécessité d'un transfert d'acides C4 entre mésophylle et gaine in situ est évidente puisque l'approvisionnement direct des cellules de gaine par le $CO_2$ atmosphérique est très limitée (question étudiée et critiquée dans la première partie). La suppression des échanges devrait entraîner l'arrêt du métabolisme photosynthétique des cellules de gaines par manque de $CO_2$. En revanche la nécessité d'un échange d'intermédiaires du cycle de Calvin, telle qu'elle apparaît dans l'interprétation n° 1 (figure 1) mérite une discussion approfondie. Les échanges observés avec les cellules de gaine, dans le cas de nos expériences, sont conformes aux hypothèses de l'interprétation n° 1 puisqu'en photosynthèse les cellules isolées rejettent du PGA et ne montrent d'activité intense que si on leur fournit un substrat réduit, DHAP ou R5P. Les cellules de gaines de maïs peuvent-elles photosynthétiser si, au moyen d'un artifice on rend les échanges PGA-DHAP(R5P) impossible ?

Bien qu'on ne dispose pas de données expérimentales publiées à ce jour, il semble que les auteurs ayant travaillé avec des cellules de gaine de maïs et sorgho préparées par macération n'aient pu observer de stimulation de la fixation du $^{14}CO_2$ par addition de substrats et cofacteurs (observation personnelle confirmée par S. Huber par communication personnelle). Aucun composé carboné, autre que le $CO_2$ ou le bicarbonate (acides $C_4$, autres métabolites, cofacteurs) ne semble pouvoir entrer dans les cellules, par suite probablement de l'obturation des plasmodesmes. De la même façon les composés présents initialement dans la cellule ne peuvent diffuser lors de l'isolement de celles-ci. Chez ces deux espèces, la vitesse de fixation du $CO_2$ reste faible : 1-3 $\mu mol.(mg\ Chl)^{-1}.h^{-1}$ alors que chez d'autres espèces du groupe 1 et des groupes 2 et 3, les cellules de gaine préparées également par macé-

ration fixent beaucoup plus activement le $CO_2$:20-120 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ [Ku et al., 1974] et voir Introduction). Une déficience de l'activité du PSII des plastes de gaine serait à l'origine de l'incapacité des cellules de maïs et sorgho à métaboliser activement le $CO_2$ ( Ku et al., 1974 et voir paragraphe suivant). Cette dernière interprétation, si elle est exacte - il faudrait s'assurer du bon état des cellules préparées par macération - démontre la nécessité des échanges entre gaine et milieu extérieur, les cellules devant recevoir des intermédiaires réduits du CRPP pour synthétiser le RuDP.

4. Hypothèses sur le rôle joué par les cellules de gaine dans le déroulement de la photosynthèse chez la feuille de maïs.

La mise en évidence chez les cellules de gaine de maïs, d'une capacité élevée à fixer le $CO_2$ en présence de substrats exogènes réduits, et à synthétiser le PGA (à raison de deux molécules par $CO_2$ fixé, publication n° 3) montre qu'elles peuvent jouer effectivement un rôle majeur dans le déroulement de l'activité photosynthétique de la feuille. Ce résultat est en désaccord complet avec l'interprétation n° 3 (Introduction, figure 5), puisque, selon celle-ci, la seule activité des cellules de gaine serait l'amylogenèse.

Etant conduit à accepter plutôt les interprétations 1 et 2 (figs 1 et 2, Introduction), nous devons essayer de nous déterminer en faveur de l'une ou l'autre hypothèse en posant la question suivante : quelle est la part prise par les cellules de gaine dans le déroulement de l'activité photosynthétique ? Synthétisent-elles une partie du PGA photosynthétique (interprétation n° 2) ou la totalité (interprétation n° 1). Il n'a pas été possible de mettre en évidence une capacité des plastes de mésophylle (ou des protoplastes) à incorporer le $^{14}C$ du $^{14}CO_2$ dans les intermédiaires du CRPP (voir Introduction). Comme nous l'avons signalé, nous avons nous-mêmes rencontré les mêmes échecs avec

les plastes isolés de maïs (deuxième partie, paragraphe I). On serait donc tenté de préférer l'interprétation n° 1 à l'interprétation n° 2 ; cependant le fait que certains auteurs aient trouvé une activité RuDPC dans le mésophylle ([Poincelot, 1972] - voir Introduction) nous incite à la prudence et nous préférons ne pas choisir entre les deux interprétations !

Un autre problème concerne la capacité intrinsèque des cellules de gaine à réduire le PGA qu'elles synthétisent. Doit-on envisager, en accord avec les interprétations 1 et 2 une coopération entre cellules de gaines et mésophylle pour l'évolution de la photosynthèse ? Les plastes de mésophylle réduiraient la fraction du pool de PGA ne pouvant être transformée dans la gaine et restitueraient ensuite à ces cellules les trioses phosphate formés. Nos expériences sont en accord avec ces interprétations puisque les cellules de gaine préparées par broyage manifestent une capacité limitée à réduire aussi bien le PGA exogène que le PGA synthétisé par les cellules, même en présence de malate exogène. En revanche elles métabolisent activement le DHAP exogène pour regénérer le RuDP.

Les résultats présentés à la fin du précédent paragraphe (3. Discussion) concernant les cellules de gaine de maïs préparés par macération paraissent être également en faveur de cette hypothèse d'un transfert de PGA et DHAP entre les deux catégories cellulaires : les cellules de gaines, rendues incapables d'utiliser les substrats réduits qui ne peuvent pénétrer dans les cellules, fixent le $CO_2$ à une vitesse très faible. L'obturation des plasmodesmes tout en empêchant (ou limitant) l'entrée des métabolites doit conserver la composition initiale du contenu cellulaire.

On peut critiquer ces résultats en objectant que les cellules de gaine ont pu être altérées au cours de leur isolement. Les systèmes photochimiques peuvent avoir subi une inactivation chez les cellules préparées par voie enzymatique : la préparation des cellules est très longue, et chez le maïs le PS II peut être très fragile. Il est peu vraisemblable qu'il en soit ainsi dans le cas de nos expériences où les cellules sont préparées par broyage : en effet l'isolement est pratiqué à basse température et est réalisé en 10 minutes. Cependant chez ce dernier matériel, il est possible que l'utilisation du NADPH fourni soit par fonctionnement des systèmes photochimiques ou par décarboxylation du malate ait été rendue difficile, par exemple si l'on envisage qu'une structure assurant un couplage entre le fonctionnement de la triose phosphate deshydrogénase à NADP et celui de l'enzyme malique ait été détériorée au cours du broyage.

Si l'on examine, pour terminer, le problème de façon plus théorique, il paraît difficile d'admettre que les plastes de gaine puissent réduire le PGA qu'ils sont susceptibles de synthétiser.

- Envisageons (en accord avec l'interprétation n° 1) que les cellules de gaine fabriquent la totalité du PGA photosynthétique. En photosynthèse de forte intensité, l'activité de synthèse des feuilles sera de 400-500 µmoles de PGA par mg Chl et par heure, celle des cellules de gaines sera donc de 1000-1250 µmoles de PGA par mg Chl et par heure en admettant que ces cellules renferment 40% de la chlorophylle des feuilles. La décarboxylation du malate fournissant au mieux 50% du NADPH nécessaire à la réduction de ce PGA (voir Introduction), les plastes de gaines devraient être capables d'une activité réductrice vis-à-vis du PGA de l'ordre de 500-625 µmoles de PGA par mg Chl et par heure.

- Si en accord avec l'interprétation n° 2, le PGA est synthétisé à la fois par le mésophylle - mais pour 25% au plus (voir Introduction) et par la gaine, la production de PGA par la gaine devient moindre mais

reste encore importante ; l'activité réductrice vis-à-vis du PGA, en photosynthèse de forte intensité, devrait être de 300 µmol.(mg Chl)$^{-1}$.h$^{-1}$ pour les plastes de gaine.

Des recherches seront nécessaires pour vérifier si les plastes de gaine sont effectivement capables de telles activités réductrices ; seuls les plastes du mésophylle peuvent utiliser activement le PGA comme oxydant de Hill [Hatch et Kagawa, 1973] et on ne doit pas oublier que plus de 60% de la chlorophylle est accumulée dans le mésophylle. Au vu de cet ensemble de résultats, il paraît raisonnable d'envisager que le PGA puisse être réduit aussi bien dans le mésophylle que dans la gaine. Cependant on ne dispose pas de preuves expérimentales convaincantes en faveur de l'existence d'un transfert de PGA et DHAP entre les deux catégories cellulaires.

# C O N C L U S I O N  G E N E R A L E

Nous avons rapporté dans le mémoire une analyse du processus d'assimilation du $CO_2$ en photosynthèse chez une plante C4, le maïs, réalisée à partir d'une étude du métabolisme des intermédiaires photosynthétiques : acides C4 et composés du cycle réductif des pentoses phosphate.

Dans une première partie a été présentée une étude du métabolisme carboné photosynthétique effectuée sur la feuille entière. Les tailles des pools des intermédiaires du CRPP et des acides C4 ont été déterminées chez la feuille en photosynthèse stationnaire. Des perturbations d'état stationnaire ou transitions ont été provoquées soit par suppression de l'alimentation en $CO_2$ ou de l'éclairement, ou par inhibition partielle de l'activité réductrice des plastes ; l'analyse des variations de taille des pools de certains intermédiaires (composés du CRPP ou acides C4) au cours des transitions a permis de démontrer l'intervention de ces composés dans le déroulement de certaines étapes essentielles du métabolisme C4. Le renouvellement des mêmes composés a été mis en évidence en photosynthèse normale ou perturbée en effectuant un marquage de courte durée des intermédiaires par le $^{14}C$.

Les résultats obtenus en ce qui concerne le CRPP, nous conduisent à admettre un déroulement normal du cycle au sein de l'ensemble des tissus assimilateurs chlorophylliens (mésophylle et gaine) chez le maïs. Quelques particularités intéressantes ont pu être mises en évidence comme l'accumulation de DHAP et de FruDP dans la feuille en photosynthèse de forte intensité. La méthode d'étude du métabolisme carboné choisie,

insuffisante en elle-même pour démontrer de façon certaine le déroulement d'une voie métabolique, fournit cependant un complément d'information indispensable à une étude d'activités enzymatiques. Ainsi la mise en évidence presque simultanée en 1969 d'un pool important de RuDP chez la feuille de maïs placée sous azote [Farineau, 1969] et de la présence de RuDPC dans les cellules de gaine [Bjorkman et Gauhl, 1969] permettait d'établir de façon à peu près certaine l'intervention d'une RuDP carboxylase et non d'une transcarboxylase en photosynthèse chez les plantes C4.

Nous avons également essayé de préciser le rôle joué par les acides C4 dans le déroulement de la photosynthèse C4, grâce à une étude des effets de perturbations provoqués par la privation de $CO_2$ ou l'arrêt de l'illumination sur :

1) les tailles des pools des acides C4 et de certains intermédiaires du CRPP : PGA, RuDP particulièrement,

2) la transmission du $CO_2$ atmosphérique (donné sous forme d'"impulsion" radioactive) vers les composés du CRPP.

Il apparaît que les acides C4 sont susceptibles de fournir du $CO_2$ pour la RuDP carboxylase en atmosphère privée de $CO_2$ ; d'autre part ces acides sont des intermédiaires quasi obligatoires sur la voie d'accès du $CO_2$ atmosphérique aux sites de la RuDPC.

L'analyse du déroulement des diverses étapes de la photosynthèse C4 au niveau cellulaire a été présentée dans la seconde partie du mémoire. Chez le maïs, seules les cellules de gaines peuvent être isolées intactes ; les cellules de mésophylle éclatant lors du broyage, il était possible d'en recueillir les plastes ; les tests classiques de fixation au $CO_2$ effectués sur ce matériel n'ont pas permis de montrer une capacité à synthétiser les intermédiaires du CRPP. Ces résultats n'apportant pas d'information originale ont été seulement signalés. En revanche, la

fixation du $CO_2$ a été étudiée de façon approfondie chez les cellules de gaines isolées ; celles-ci synthétisent activement le PGA à condition d'être alimentées en substrats réduit du cycle de Calvin ; les cellules manifestent une capacité très limitée à métaboliser le PGA exogène (fourni comme substrat) ou endogène (fabriqué par les cellules elles-mêmes). L'addition de malate assure aux cellules la fourniture de $CO_2$ et du pouvoir réducteur sous forme de NADPH ; cependant cette source de pouvoir réducteur ne représente qu'un appoint, insuffisant pour rétablir une activité photosynthétique normale au sein des cellules. Toutefois il est possible que notre matériel ait été altéré au cours de l'isolement et que l'utilisation du NADPH formé lors de la décarboxylation du malate ne puisse se faire de façon optimale. Nous avons été amené au cours de la discussion de nos résultats à admettre comme possible une coopération entre les cellules de gaine et de mésophylle pour l'évolution de la photosynthèse ; il paraît, à ce jour, improbable, au vu des résultats expérimentaux que les cellules de gaine puissent réduire activement le PGA qu'elles sont susceptibles de synthétiser ; la capacité réductrice des plastes de mésophylle vis-à-vis du PGA ayant été démontrée [ Hatch et Kagawa, 1973 ], l'intervention de ces plastes in situ (dans la feuille) pour l'évolution de l'étape réductrice nous paraît envisageable à condition d'admettre des échanges de PGA et DHAP entre gaine et mésophylle (ce qui n'est pas démontré).

En conclusion, nous nous rallions, en ce qui concerne l'interprétation globale du déroulement de la photosynthèse au sein des tissus des feuilles, aux interprétations 1 et 2 admises par la majorité des chercheurs (figs 1 et 2, Introduction). Il ne paraît pas possible de choisir entre les deux interprétations précédentes bien que beaucoup de travaux montrent que l'activité RuDPC dans le mésophylle est très réduite.

# B I B L I O G R A P H I E


Andersen K.S., Bain J.M., Bishop D.G. and Smillie R.M., 1972 - Photosystem II activity in agranal bundle-sheath chloroplasts from Zea mays. Plant Physiol., 49, 461-466.

Anderson J.M., Boardman N.K. and Spencer D., 1971a - Phosphorylation by intact bundle-sheath chloroplasts of maize. Biochim. Biophys. Acta, 245, 253-258.

Anderson J.M., Woo K.C. and Boardman N.K., 1971b - Photochemical systems in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of C4 plants. Biochim. Biophys. Acta, 245, 398-408.

Anderson J.M., Woo K.C. and Boardman N.K., 1972 - Deficiency of photosystem II in agranal bundle-sheath chloroplasts of Sorghum bicolor and Zea mays. In Proceedings of the 2nd International congress on Photosynthesis research, Stresa (Italy). G. Forti, M. Avron and A. Melandri, eds. Junk W.N.V. The Hague, Publ., Vol. 1, pp 611-619.

André M., 1966 - Un monochromateur solaire à usage biologique. In : Currents in photosynthesis, Thomas J.B. and Goodheer J.C. eds., Donker Publ. Rotterdam, pp 305-312.

Andrews T.J., Johnson H.S., Slack C.R. and Hatch M.D., 1971 - Malic enzymes and aminotransferases in relation to 3-phosphoglycerate formation in plants with the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Phytochemistry, 10, 2005-2013.

Andrews T.J., Lorimer G.H. and Tolbert N.E., 1973 - Ribulose diphosphate oxygenase. I Synthesis of phosphoglycolate by fraction I protein of leaves. Biochemistry, 12, 11-18.

Aronoff S., Barker H.A. and Calvin M., 1947 - Distribution of labelled carbon in sugars from barley. J. Biol. Chem., 169, 459-460.

Badger M.R. and Andrews T.J., 1974 - Effects of $CO_2$,$O_2$ and Temperature on a high affinity form of RuDP carboxylase-oxygenase from spinach. Biochem. Biophys. Res. Comm., 60, 204-210.

Bahr J.T. and Jensen R.G., 1974 - On the activity of RuDP carboxylase with $CO_2$ and $O_2$ from leaves extracts of Zea mays. Biochem. Biophys. Res. Comm., 57, 1180-1185.

Baldry C.W., Bucke C. and Coombs J., 1969 - Light/phosphoenol pyruvate dependent carbon dioxide fixation by isolated sugar cane chloroplasts. Biochem. Biophys. Res. Comm., 37, 828-832.

Baldry C.W., Bucke C., Coombs J. and Gross D., 1970a - Phenols, phenol oxydase and photosynthetic activity of chloroplasts isolated from sugar cane and spinach. Planta, 94, 107-123.

Baldry C.W., Bucke C. and Coombs J., 1970b - Effects of some phenoloxydase inhibitors on chloroplasts and carboxylating enzymes of sugar-cane and spinach. Planta, 94, 124-133.

Baldry C.W., Bucke C. and Coombs J., 1971 - Progressive release of carboxylating enzymes during mechanical grinding of sugar cane leaves. Planta, 97, 310-319.

Bassham J.A., 1968 - The Calvin photosynthetic cycle in algae and leaves. In : Proceedings of Int. Symp. on "Photosynthesis in sugar-cane", Coombs J., ed, pp 1-13.

Bassham J.A., 1971 - Photosynthetic carbon metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 2877-2882.

Bassham J.A., Benson A.A., Kay L.D., Harris A.Z., Wilson A.T. and Calvin M., 1954 - The path of carbon in photosynthesis. XXI. The cyclic regeneration of carbon dioxide acceptor. J. Amer. Chem. Soc., 76, 1760-1770.

Bassham J.A. and Calvin M., 1957 - The path of carbon in photosynthesis. Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs N.Y.

Bassham J.A. and Kirk M., 1960 - Dynamics of the photosynthesis of carbon compounds. I Carboxylation reactions. Biochim. Biophys. Acta, 43, 447-464.

Bassham J.A. and Kirk M., 1973 - Sequence of formation of phosphoglycolate and glycolate in photosynthesizing Chlorella pyrenoidosa. Plant Physiol., 52, 407-411.

Bassham J.A., Kirk M. and Jensen R.G., 1968 - Photosynthesis by isolated chloroplasts. I Diffusion of labelled photosynthetic intermediates between chloroplasts and suspending medium. Biochim. Biophys. Acta, 153, 211-218.

Bergmeyer H.U., 1962 - Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie G.M.B.H., Weinheim/Bergst.

Berry J.A., Downton W.J.S. and Tregunna E.B., 1970 - The photosynthetic carbon metabolism of Zea mays and Gomphrena globosa : the location of the $CO_2$ fixation and the carboxyl transfer reactions. Can J. Bot., 48, 777-786.

Bishop D.G., Andersen K.S. and Smillie R., 1972 - pH dependence and cofactor requirements of photochemical reactions in maize chloroplasts. Plant. Physiol., 50, 774-777.

Bishop D.G., 1974 - Lamellar structure and composition of chloroplasts in relation to photosynthetic electron transfer. Photochem. Photobiol., 20, 281-299.

Bjorkman O. and Gauhl E., 1969 - Carboxydismutase activity in plants with and without β-carboxylation photosynthesis. Planta, 88, 197-203.

Bjorkman O., Hiesey W.M., Nobs M., Nicholson F. and Hart R.W., 1968 - Effect of oxygen concentration on dry matter production in higher plants. In : Carn. Inst. Year Book, Carnegie Inst. of Whashington, D.C., pp 228-245.

Black C.C. Jr., 1969 - Biochemical basis for plant competition. Weed Science, 17, 338-344.

Black C.C.J$^{r}$., 1971 - Ecological implications of dividing plants into groups with distinct production capacities. Adv. Ecol. Res., 7, 87-114.

Black C.C.J$^{r}$., 1973 - Photosynthetic carbon fixation in relation to net $CO_2$ uptake. Annual Rev. Plant Physiol., 24, 253-286.

Black C.C.J$^{r}$., Edwards G.E., Kanai R. and Mollenhauer H.H., 1972 - Photosynthetic assimilation of carbon in certain higher plants. In : Proceedings of 2$^{nd}$ International Congress of Photosynthesis research. Forti G., Avron M. and Melandri A. éds. Junk W., N.V., The Hague, Publ. Vol. I, pp 1745-1757.

Black C.C.J$^{r}$. and Mollenhauer H.H., 1971 - Structure and distribution of chloroplasts and other organelles in leaves with various rates of photosynthesis. Plant Physiol., 47, 15-23.

Bowes G., Ogren W.L. and Hageman R.H., 1971 - Phosphoglycolate production catalysed by ribulose diphosphate carboxylase. Biochem. Biophys. Res. Comm., 45, 716-722.

Brangeon J., 1973 - Compared ontogeny of the two types of chloroplasts of Zea mays. J. de Microscopie, 16, 233-242.

Brangeon J., Krivitzky M. et Bourdu R., 1971 - Le fractionnement des deux formes chloroplastiques des feuilles de Zea mays. Photosynthetica, 5, 384-388.

Brulfert J., Guerrier D. and Queiroz O., 1973 - Photoperiodism and enzyme activity : balance between inhibition and induction of the Crassulacean acid metabolism. Plant Physiol., 51, 220-222.

Bucke C. and Long S.P., 1971 - Release of carboxylating enzymes from maize and sugar cane leaf during progressive grinding. Planta, 99, 199-210.

Bucke C. and Coombs J., 1974 - Regulation of $CO_2$ assimilation in Pennisetum purpureum. In : Proceedings of 3$^{rd}$ Int. Congress on Photosynthesis, Rehovot, 2-6 sept 1974, M. Avron ed. Elsevier Sc. Publ. Co, pp 1567-1571.

Burr G.O., Hartt C.E., Brodie H.W., Tanimoto T., Kortschak H.P., Takahashi D., Ashton F.M. and Coleman R.E., 1957 - The sugarcane plant. In Ann. Rev. Plant Physiol., 8, 275-308.

Carles J., Schneider A. et Lacoste A.M., 1958 - Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques. Bull. Soc. Chim. Biol., 40, 221-232.

Chen T.M., Campbell W.H., Dittrich F., and Black C.C., 1973 - Distribution of carboxylation and decarboxylation enzymes in isolated mesophyll cells and bundle-sheath strands of C4 plants. Biochem. Biophys. Res. Comm., 51, 461-467.

Chollet R., 1973 - The effect of oxygen on $^{14}CO_2$ fixation in mesophyll cells isolated from Digitaria sanguinalis (L.) Scop. leaves. Biochem. Biophys. Res. Comm., 55, 850-856.

Chollet R. and Ogren W.L., 1972 - Oxygen inhibits maize bundle-sheath photosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm., 46, 2062-2066.

Chollet R. and Ogren W., 1973 - Photosynthetic carbon metabolism in isolated maize bundle-sheath strands. Plant Physiol., 51, 787-792.

Chollet R., Ogren W.L. and Bowes G., 1974 - Oxygen effects in C3 and C4 photosynthesis. What's New in Plant Physiology, 6, n° 1, 1-5.

Coombs J., 1971 - The potential of higher plants with the phosphopyruvic acid cycle. Proc. Roy. Soc. B, 179, 221-235.

Coombs J. and Baldry C.W., 1972 - The C4 pathway in Pennisetum purpureum. Nature, 238, 268-270.

Coombs J., Baldry C.W. and Bucke C., 1973 - The C4 pathway in Pennisetum purpureum. II Malate dehydrogenase and Malic enzyme. Planta, 110, 109-120.

Créach E., Michel J.P. et Thibault P., 1974 - Aspartic acid as an internal reservoir in Zea mays : effect of oxygen concentration and of far-red illumination. Planta, 118, 91-100.

Czok R. and Eckert L., 1962 - Bestimmung von Substraten : D-Glycerat-3-phosphat, D-Glycerat-2-phosphat, Phosphoenolpyruvat. In : Methoden der enzymatischen Analyse, hrsgeg von H.U. Bergmeyer, Verlag Chemie, G.M.B.H., Weinheim Bergst., pp 224-228.

Deleens E., Lerman J.C. Nato A. and Moyse A., 1974 - Carbon isotope discrimination by the carboxylating reaction in C3, C4 and CAM plants. In : Proceedings of 3rd Int. Congress on Photosynthesis, Rehovot, 2-6 sep 1974, M. Avron ed, Elsevier Sc. Publ. Co, Amsterdam, pp 1267-1276.

Dittrich P., Salin M.L. and Black C.C.Jr., 1973 - Conversion of carbon 4 of malate into products of the pentose cycle by isolated bundle-sheath strands of Digitaria sanguinalis (L.) Scop. leaves. Biochem. Biophys. Res. Comm., 55, 104-110.

Downton W.J.S., 1970 - Preferential C4-dicarboxylic acid synthesis, the post illumination $CO_2$ burst, carboxyl transfer step and grana configurations in plants with C4 photosynthesis. Can. J. Bot., 48, 1795-1800.

Downton W.J.S., 1971 - Adaptative and evolutionnary aspects of C4 photosynthesis. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O. éds., New-York, Wiley-Interscience, pp 3-17.

Edwards G.E., 1974 - Diversification of C4 plants. What's New in Plant Physiology, 6, n° 6, 1-7.

Edwards G.E. and Black C.C.Jr., 1971 - Photosynthesis in mesophyll cells and bundle-sheath cells isolated from Digitaria sanguinalis (L) Scop. leaves. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O. éds., New-York, Wiley-Interscience, pp 153-168.

Edwards G.E., Kanai R. and Black C.C., 1971 - Phosphoenolpyruvate carboxykinase in leaves of certain plants which fix $CO_2$ by the C4 dicarboxylic acid cycle of photosynthesis. Biochem. Biophys. Res. Comm., 45, 278-285.

Farineau J., 1966 - Etude de la genèse des composés phosphorylés au sein de feuilles vertes illuminées dans des atmosphères de compositions variées. C.R. Acad. Sci. (Paris), 263, 36-39.

Farineau J., 1969 - Métabolisme de quelques composés phosphorylés et photophosphorylation "in vivo" chez les feuilles de maïs. Planta, 85, 135-156.

Farineau J., 1971 - A comparative study of the activities of photosynthetic carboxylation in a C4 and a Calvin type plant (the sites of $CO_2$ fixation in C4 plants). In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O., éds. Wiley-Interscience, New-York, pp 202-210.

Farineau J., 1972 - Studies of light and dark fixation of $CO_2$ in C4 plants. In : Proceedings of 2nd Int. Congress on Photosynthesis. Forti G., Avron M. and Melandri A., éds. Junk W.N.V., The Hague, Vol. 3, pp 1971-1979.

Farineau J., 1975a - Photoassimilation of $CO_2$ by isolated bundle-sheath strands of Zea mays. I Stimulation of $CO_2$ assimilation by adding various intermediates of the photosynthetic cycle ; evidence for a deficient photosystem II activity. Physiol. Plant., 33, 300-309.

1975b II Role of malate as a source of $CO_2$ and reducing power for the photosynthetic activity of isolated bundle-sheath cells of Zea mays. Physiol. Plant., 33, 310-315.

Elkin L. and Park R., 1975 - Chloroplast fluorescence of C4 plants. III Fluorescence spectra and relative fluorescence yields of bundle-sheath and mesophyll chloroplasts. Planta, 127, 37-47.

Galmiche J.M., 1963 - Influence de différentes longueurs d'onde de la lumière sur la distribution du carbone 14 dans les premiers produits de la photosynthèse en utilisant des temps d'absorption très courts du $CO_2$ par des feuilles de tomate. In : La Photosynthèse. Coll. Int. du C.N.R.S., Ed. du C.N.R.S., pp 589-597.

Galmiche J.M., 1968 - Photosynthetic incorporation of carbon from $CO_2$ into malic acid and phosphoglyceric acid in Zea mays. In : Proceedings of Int. Symp. on "Photosynthesis in Sugarcane", Coombs J. éd., pp 36-39.

Galmiche J.M., 1973a - Studies on the mechanism of glycerat 3 phosphate synthesis in tomato and maize leaves. Plant Physiol., 51, 512-519.

Galmiche J.M., 1973b - Carboxylation primaire chez les végétaux supérieurs. Etude cinétique à l'aide du $^{14}CO_2$. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Paris Sud. 177 pp.

Gibbs M., 1971 - Carbohydrate metabolism by chloroplasts. In : Structure and function of chloroplasts. M. Gibbs, éd., Springer-Verlag, p. 193.

Gracen V.E., Hilliard J.H., Brown R.H. and West S.H., 1972 - Peripheral reticulum in chloroplasts of plants differing in $CO_2$ fixation patways and photorespiration. Planta, 107, 189-204.

Guérin de Montgareuil P., André M. et Seimandi N., 1967 - Capacités en oxygène photosynthétique dans le cas d'une feuille aérienne. C.R. Acad. Sci. (Paris), 265, 485-488.

Guillot-Salomon T., 1973 - Isolement de plastes et de mitochondries en bon état structural et physiologique. Intérêt pour l'étude des lipides polaires constitutifs de leurs systèmes membranaires. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Pierre et Marie Curie, 129 pp et planches.

Gutierrez M., Gracen V.E. and Edwards G.E., 1974a - Biochemical and cytological relationships in C4 plants. Planta, 119, 279-300.

Gutierrez M., Kanai R., Huber S.C., Ku S.B. and Edwards G.E., 1974b - Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle-sheath cells of various type of C4 plants. I Carboxylases and $CO_2$ fixation studies. S. Pflanzenphysiol., 72, 305-319.

Haberlandt G., 1914 - Physiologische Pflanzenanatomie. Leipzig, Engelmann, cité par Black C.C. 1971.

Hatch M.D., 1971a - The C4-pathway of photosynthesis. Evidence for an intermediate pool of carbon dioxide and the identity of the donor C4 dicarboxylic acid. Biochem. J., 125, 425-432.

Hatch M.D., 1971b - Mechanism and function of the C4 pathway of photosynthesis. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O. éds., Wiley - Interscience, New York, pp 139-152.

Hatch M.D. and Kagawa T., 1973 - Enzymes and functional capacities of mesophyll chloroplasts from plants with C4 pathway photosynthesis. Arch. Biochem. Biophys., 159, 842-853.

Hatch M.D., Kagawa T. and Craig S., 1975 - Subdivision of C4-pathway species based on differing C4 acid carboxylating systems and ultrastructural features. Aust. J. Plant Physiol., 2, 111-128.

Hatch M.D. and Slack C.R., 1966 - Photosynthesis by sugar cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. Biochem J., 101, 103-111.

Hatch M.D. and Slack C.R., 1968 - A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem. J., 106, 141-146.

Hatch M.D. and Slack C.R., 1969a - Studies on the mechanism of activation and inactivation of pyruvate phosphate dikinase. A possible regulatory role for the enzyme in the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem. J., 112, 549-559.

Hatch M.D. and Slack C.R., 1969b - NADP specific malate dehydrogenase and glycerate kinase in leaves and evidence for their location in chloroplasts. Biochem. Biophys. Res. Comm., 34, 589-593.

Hatch M.D. and Slack C.R., 1970 - Photosynthetic $CO_2$ fixation pathway. In : Annual Rev. Plant Physiol., 21, 141-162.

Hatch M.D., Slack C.R. and Bull T.A., 1969 - Light-induced changes in the content of some enzymes of the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis and its effect on other characteristics of photosynthesis. Phytochemistry, 8, 697-706.

Hatch M., Slack C.R. and Johnson H.S., 1967 - Further studies on a new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in sugar-cane and its occurence in other plant species. Biochem. J., 102, 417-422.

Heber U., 1969 - Conformational changes of chloroplasts induced by illumination of leaves in vivo. Biochim. Biophys. Acta, 180, 302-319.

Heber U., 1974 - Metabolite exchange between chloroplasts and cytoplasm. In : Annual Rev. Plant Physiol., 25, 393-421.

Heber U., Santarius K.A., Hudson M.A. and Hallier U.W., 1967 - Untersuchungen zur intrazellularen Verteilung von Enzymen und Substraten in der Blattzelle. I Intrazellularer Transport von Zwischenprodukten der Photosynthese im Photosynthese-Gleichgewicht und im Dunkel-Licht-Dunkel-Wechsel. Z. Naturforsch., 22B, 1189-1199

Heldt H.W., Sauer F. and Rapley, L., 1972 - Differentiation of the permeability properties of the two membranes of the chloroplast envelope. In : Proceedings of the 2nd Int. Congress on Photosynthesis research. Forti G., Avron M. and Melandri A. eds, Junk W.N.V. The Hague, Vol. 2, pp 1345-1355.

Hind G., Nakatani H.Y. and Izawa S., 1974 - Light - induced redistribution of ions in suspensions of chloroplasts thylakoid membranes. Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A., 71, 1484-1488.

Horvath G. and Faludi-Daniel A., 1972 - Accumulation of pigments in mesophyll and bundle-sheath chloroplasts of greening maize leaves. Photosynthetica, 6, 410-414.

Huang A.H.C. and Beevers H., 1972 - Microbody enzymes and carboxylases in sequential extracts from C4 and C3 leaves. Plant Physiol., 50, 242-248.

Huber S.C. and Edwards G.E., 1975 - Regulation of oxaloacetate, aspartate and malate formation in mesophyll extracts of three types of C4 plants. Plant Physiol., 56, 324-331.

Huber S., Kanai R. and Edwards G.E., 1973 - Decarboxylation of malate by isolated bundle-sheath cells of certain plants having the C4-dicarboxylic acid cycle of photosynthesis. Planta, 113, 53-66.

Irvine J.E., 1970 - Evidence for photorespiration in tropical grasses. Physiol. Plant., 23, 607-612.

Jackson W.A. and Volk R.J., 1970 - Photorespiration. In : Annual Rev. Plant Physiol., 21, 385-432.

Jensen R.G. and Bassham J.A., 1966 - Photosynthesis by isolated chloroplasts. Proc. Natl. Ac. Sc. USA, 56, 1095-1101.

Jensen R.G., Francki I.B. and Zaitlin M., 1971 - Metabolism of separated leaf cells. I Preparation of photosynthetically active cells from Tobacco. Plant Physiol., 48, 9-13.

Johnson H.S. and Hatch M.D., 1968 - Distribution of the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis and its occurence in Dicotyledonous plants. Phytochemistry, 7, 375-380.

Johnson H.S. and Hatch M.D., 1969 - The C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Identification of intermediates and products and quantitative evidence for the route of carbon flow. Biochem. J., 114, 127-134.

Kagawa T. and Hatch M.D., 1974 - C4 acids as the source of carbon dioxide for Calvin cycle photosynthesis by bundle-sheath cells of the C4 pathway species Atriplex spongiosa. Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 1326-1332.

Kanai R. and Edwards G.E., 1973 - Separation of mesophyll protoplasts and bundle-sheath cells from maize leaves for photosynthetic studies. Plant Physiol., 51, 1133-1137.

Karpilov Y.S., 1970$_a$ - The photosynthesis of xerophytes (en russe). Publication de l'Academie de Moldavie.

Karpilov Y.S., 1970 b - Cooperation photosynthesis of xerophytes (en russe). Publication de l'Académie de Moldavie.

Karpilov Y.S., Malishev O.G., Persanov V.M. and Kusnetsova L.G., 1974 - Photosynthetic carbon metabolism of maize leaves (en russe). In : Photosynthesis in Maize., Y.S. Karpilov ed., p 115.

Kluge M. and Osmond C.G., 1971 - Pyruvate Pi dikinase in Crassulacean acid metabolism. Naturwissenschaften, 58, 414-415.

Kortschak H.P., Hartt C.E. and Burr G.O., 1965 - Carbon dioxide fixation in sugarcane leaves. Plant Physiol., 40, 209-213.

Ku S.B., Gutierrez M. and Edwards G.E., 1974a - Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle-sheath cells of various types of C4 plants. II Chlorophyll and Hill reaction studies. Z. Pflanzenphysiol., 72, 320-337.

Ku S.B., Gutierrez M. and Edwards G.E., 1974b - Localization of the C4 and C3 pathways of photosynthesis in the leaves of Pennisetum and other C4 species. Insignificance of phenol oxidase. Planta, 119, 267-278.

Kulandaivelu G. and Gnanam A., 1974 - Physiological studies with isolated leaf cells. Early products of photosynthesis and their metabolic interconversions. Plant Physiol., 54, 569-574.

Laber L., Latzko E. and Gibbs M., 1974 - Photosynthetic path of carbon dioxide in Spinach and Corn leaves. J. Biol. Chem., 249, 3436-3441.

Laetsch W.M., 1971 - Chloroplasts structural relationships in leaves of C4 plants. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O., eds., New-York, Wiley Interscience, pp 323-349.

Laetsch W.M., 1974 - The C4 syndrome, a structural analysis. Annual Rev. Plant Physiol., 25, 27-52.

Lerman J.C., Deleens E., Nato A. and Moyse A., 1974 - Variation in the carbon isotope composition of a plant with crassulacean acid metabolism. Plant Physiol., 53, 581-584.

Lorimer J.H., Andrews T. and Tolbert N.E., 1973 - Ribulose diphosphate oxygenase. II Further proof of reactions products and mechanisms of action. Biochemistry, 12, 18-23.

Magomedov I.M., Chernyad'ev I.I., Kovaleva L.B. and Doman D.G., 1973 - Localization of ribulose diphosphate carboxylase in the leaves of plants with C4 pathway of photosynthesis. Dokl. Biochem., 213, 555-556.

Mayne B.C., Dee A.M. and Edwards G.E., 1974 - Photosynthesis in mesophyll protoplasts and bundle-sheath cells of various types of C4 plants. III Fluorescence emission spectra, delayed light emission and P 700 content. Z. Pflanzenphysiol., 74, 275-291.

Metcalfe C.R., 1957 - Anatomy of the Monocotyledons I Graminaea. Clarendon Press.

Michel J.P., 1971 - Acide aspartique et capacité en oxygène photosynthetique chez le maïs. Action du rouge lointain. C.R. Acad. Sc. Paris, 272, 2455-2458.

Miyachi S. and Hogetsu D., 1970 - Light-enhanced carbon dioxide fixation in isolated chloroplasts. Plant and Cell Physiol., 11, 927-936.

Nishimura M. and Azawa T., 1974 - Studies on spinach ribulose biphosphate carboxylase. Carboxylase and oxygenase reaction examined by immunochemical methods. Biochemistry, 13, 2277-2281.

Ogren W. and Bowes G., 1971 - Ribulose diphosphate carboxylase regulates soybean photorespiration. Nature, 230, 159-160.

O'Neal D., Hew C.S., Latzko E. and Gibbs M., 1972 - Photosynthetic carbon metabolism of isolated corn chloroplasts. Plant Physiol., 49, 607-614.

Osmond C.B., 1971a - Metabolite transport in C4 photosynthesis. Aust. J. Biol. Sc., 24, 159-163.

Osmond C.B., 1971b - The absence of photorespiration in C4 plants : real or apparent ? In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O., eds., Wiley-Interscience, New-York, pp 472-482.

Osmond C.B. and Avadhani P.N., 1970 - Inhibition of the β-carboxylation pathway of $CO_2$ fixation by bisulfite compounds. Plant Physiol., 45, 228-230.

Osmond C.B. and Harris B., 1971 - Photorespiration during C4 photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta, 234, 270-282.

Pan D., 1975 - Studies on the carboxylation enzymes of leaves and chloroplasts of Zea mays L. I A thermostable phosphoenolpyruvate acid carboxylase. II Evidence for a transcarboxylation reaction in chloroplasts. Ph. D., Université de Manitoba.

Pan D. and Waygood E.R., 1971 - A fundamental thermostable cyanide sensitive phosphoenol pyruvate acid carboxylase in photosynthetic and other organisms. Can. J. Bot., 49, 631-643.

Pedersen T.A., Kirk M. and Bassham J.A., 1966 - Light-dark transients in levels of intermediate compounds during photosynthesis in air-adapted Chlorella. Physiol. Plant., 19, 219,231.

Poincelot R.P., 1972 - The distribution of carbonic anhydrase and ribulose diphosphate carboxylase in maize leaves. Plant Physiol., 50, 336-340.

Poskuta J., 1969 - Photosynthesis, respiration and post illumination fixation of $CO_2$ by corn leaves as influenced by light and oxygen concentration. Physiol. Plant., 22, 76-85.

Pyliotis N.A., Woo K.C. and Downton W.J.S., 1971 - Thylakoid aggregation correlated with chlorophyll a/chlorophyll b ratio in some C4 species. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O., eds, Wiley - Interscience, New-York, pp. 406-412.

Rathnam C.K.M. and Das V.S.R., 1975a - Aspartate type C4 photosynthetic carbon metabolism in leaves of Eleusine coracana Gaertn. Z. Pflanzenphysiol., 74, 377-393.

Rathnam C.K.M. and Das V.S.R., 1975b - Inter and intra cellular distribution of carbonic anhydrase, PEP carboxylase and RuDP carboxyla in leaves of Eleusine coracana, a C4 plant. Z. Pflanzenphysiol. 75, 360-364.

Rathnam C.K.M. and Edwards G.E., 1975 - Intracellular localization of certain photosynthetic enzymes in bundle-sheath cells of plants possessing the C4 pathway of photosynthesis. Arch. Biochem. Biophys., 171, 214-225.

Salin M.L., Campbell W.H. and Black C.C., 1973 - Oxaloacetate as the Hill oxydant in mesophyll cells of plants possessing the C4-dicarboxylic acid cycle of leaf photosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sc. USA, 70, 3730-3734.

Samejima M. and Miyachi S., 1971 - Light-enhanced carbon dioxide fixation in maize leaves. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O., eds, Wiley-Interscience, New-York, pp 211-217.

Santarius K.A. and Heber U., 1965 - Changes in the intracellular levels of ATP, ADP, AMP and Pi and regulatory function of the adenylate system in leaf cells during photosynthesis. Biochim. Biophys. Acta., 102, 39-54.

Schantz H.L. and Piemeisel L.N., 1927 - The water requirements of plants at Akron, Colorado.J. Agric. Res., 34, 1093-1189 ; cité par Black C.C., 1971.

Signol M., 1965 - Modifications morphologiques, pigmentaires et cytologiques induites chez divers groupes de végétaux par quelques substances antichlorophylliennes. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Nat., Université de Paris, 170 pp et Planches.

Simonis W. and Urbach W., 1973 - Photophosphorylation in vivo. In Ann. Rev. Plant Physiol., 24, 89-114.

Slack C.R., 1969 - Localization of certain photosynthetic enzymes in mesophyll and parenchyma sheath chloroplasts of maize and Amaranthus palmeri. Phytochemistry, 8, 1387-1391.

Slack C.R. and Hatch M.D., 1967 - Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses. Biochem. J., 103, 660-665.

Slack C.R., Hatch M.D. and Goodchild D.J., 1969 - Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the C4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. Biochem. J., 114, 489-498.

Slatyer R.O., 1971 - Relationship between plant growth and leaf photosynthesis in C3 and C4 species of Atriplex. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O., eds., Wiley-Interscience, New-York, pp 76-81.

Smillie R.M., Andersen K.S., Tobin N.F., Entsch B. and Bishop D.G., 1972a - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate photoreduction from water by agranal chloroplasts isolated from bundle-sheath cells of maize. Plant Physiol., 49, 471-475.

Smillie R.M., Bishop D.G. and Andersen K.S., 1972b - The photosynthetic electron transfer system in agranal chloroplasts. In Proceedings of the 2nd International congress on Photosynthesis research, Stresa (Italy). G. Forti, M. Avron and A. Melandri eds. Junk W.N.V. the Hague, Publ., Vol. pp 779-788.

Strehler B.L., 1953 - Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms. II Adenosine triphosphate and photosynthesis. Arch. Biochem., 43, 67-79.

Tarchevsky I.A. et Karpilov Y., 1963 - On the nature of the product of short time photosynthesis. Fiziol. Rast., 10, 229-231.

Thibault P., 1973 - Photojet de $CO_2$ et réserves internes en gaz carbonique chez Zea mays. Planta, 114, 109-118.

Ting I.P., 1971 - Nonautotrophic $CO_2$ fixation and crassulacean acid metabolism. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O., eds., Wiley - Interscience, New-York, pp 169-185.

Tolbert N.E., 1971 - Leaf microbodies and photorespiration. In : Photosynthesis and Photorespiration, Hatch M.D., Osmond C.B. and Slatyer R.O., eds, Wiley-Interscience, New-York, pp 458-471.

Tolbert N.E. and Ryan F.J.,1974- Glycolate biosynthesis by ribulose diphosphate carboxylase/oxygenase. In: Proceedings of 3rd Int. Congress on Photosynthesis, Rehovot, 2-6 sept.1974, M.Avron ed, Elsevier Sc.Publ.Co,Amsterdam,pp 1267-1276.

Tyszkiewicz E., 1962 - An improved solvent system for the paper chromatography of phosphate esters. Analyt. Biochem., 3, 164-172.

Ullrich W., Urbach W., Santarius K.A. and Heber U., 1965 - Die Verteilung des Orthophosphates auf Plastiden, Cytoplasma und Vacuole in der Blatzelle und ihre Veränderung im Licht-Dunkel Wechsel. Z. Naturforschg., 20b, 905-910.

Usuda H., Matsushima H. and Miyachi S., 1974 - Assimilation of carbon dioxide in mesophyll chloroplasts and bundle-sheath strands mechanically isolated from corn leaves. Plant and Cell Physiol., 15, 517-526.

Usuda H., Kanai R., and Miyachi S., 1975 - Carbone dioxide assimilation and photosystem II deficiency in bundle-sheath strands isolated from C4 plants. Plant and Cell Physiol., 16, 485-494.

Warburg O., 1920, Biochem. Z., 103, 188-217, cité par Chollet et al., 1974.

Weissbach A., Horecker B.L. and Hurwitz J., 1956 - The enzymatic formation of phosphoglyceric acid from ribulose diphosphate and carbon dioxide. J. Biol. Chem., 218, 795-810.

Whelan T., Sackett W.M., and Benedict C.R., 1970 - Carbon isotope discrimination in a plant possessing the C4 dicarboxylic pathway. Biochem. Biophys. Res. Comm., 41, 1205-1210.

Whelan T., Sackett W.M. and Benedict C.R., 1973 - Enzymatic fractionation of carbon isotopes by phosphoenolpyruvate carboxylase from C4 plants. Plant Physiol., 51, 1051-1054.

Wilson A.T. and Calvin M., 1955 - The photosynthetic cycle $CO_2$ dependent transients. J. Amer. Chem. Soc., 77, 5948-5957.

Woo K.C., Anderson J.M., Boardman N.K., Downton W.J.S., Osmond C.B. and Thorne S.W., 1970 - Deficient photosystem II in agranal bundle-sheath chloroplasts of C4 plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 18-25.

Zelitch I., 1975 - Improving the efficiency of photosynthesis. Science, 188, 626-633.

# A N N E X E

Photoassimilation du $CO_2$ par les cellules isolées de feuilles d'une plante C3, l'épinard.

Des cellules isolées de mésophylle de feuilles d'épinard ont été préparées par macération enzymatique en milieu hypertonique (environ 850 milliosmolaire) selon la méthode de Jensen et al. [1971]. Les cellules ont été incubées, sous éclairement, pendant 10 minutes, en présence de bicarbonate $^{14}C$, dans un milieu B (voir publication n° 3, [Farineau 1975a]) d'osmolarité 850 milliosmoles/l.

En milieu hypertonique (850 milliosmoles/l), les cellules manifestent une forte capacité d'assimilation du $CO_2$, une faible perméabilité aux substrats du cycle de Calvin : on observe une faible diffusion des composés marqués par le $^{14}C$ hors des cellules et l'addition d'intermédiaires du CRPP ne stimule pas la fixation du $CO_2$ (tableau 12). Le $^{14}C$ est incorporé principalement dans les composés finaux du métabolisme photosynthétique. Ces résultats démontrent le fonctionnement autonome des cellules isolées d'épinard en photosynthèse. L'observation de telles cellules en microscopie photonique montre que les plasmodesmes sont obturés (M. Signol, communication personnelle).

Incubées en milieu 400 milliosmolaire, les cellules montrent une capacité plus faible d'assimilation du $CO_2$ (tableau 12). La distribution du $^{14}C$ dans les composés synthétisés est modifiée : le marquage des intermédiaires du CRPP, et particulièrement du DHAP, est accru au détriment de celui des produits finaux. La sortie des composés marqués hors des cellules, est beaucoup plus importante, et une faible stimulation de la fixation du $CO_2$ par addition de R5P est observée. Or le choc osmotique débouche les plasmodesmes ; on remarquera

| Milieu d'incubation | | Vitesse de fixation du $CO_2$ | % du $^{14}C$ soluble à l'extérieur des cellules | Distribution du $^{14}C$ total fixé (en pourcentage) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Osmolarité (milliosmoles) | | | | PGA et comp.voisins | sucres phosp. | sucres ac.amin. |
| 850 | Témoin | 41 | 12 | 6,5 | 21 (DHAP 1,5) | 68 |
| | + R5P | 39 | 7 | 7 | 19 (DHAP 1,5) | 67 |
| 400 | Témoin | 13 | 31 | 16 | 22 (DHAP 8,5) | 57 |
| | + R5P | 17 | 42 | 14 | 29,5 (DHAP 11,5) | 54 |

Tableau 12 Cellules isolées d'épinard préparées par digestion enzymatique [Jensen et al., 1971]). Incubation dans un milieu B (Pub. n° 3) d'osmolarité 850 ou 400 milliosmoles/l, contenant du bicarbonate-$^{14}C$ mM (1 µCi/µmole). Témoin : milieu minimum ; + R5P : addition de ribose 5 phosphate 4 mM. PGA et comp.voisins : PGA, PEP, pyruvate, glycérate ; sucres phos. : oses mono et di phosphorylés, DHAP ; sucres et ac.amin. sucres solubles, amidon, glycine, sérine, alanine, malate et aspartate. Cellules fixées après 10 minutes de photosynthèse. Pour les déterminations des vitesses de fixation du $CO_2$, de la répartition des composés solubles marqués entre cellules et milieu d'incubation, et de la distribution du $^{14}C$ dans les composés marqués, voir la publication n° 3.

que, dans ces dernières expériences conduites en milieu isotonique, le marquage des composés photosynthétiques est assez semblable à celui qui est observé dans des expériences identiques, lorsque des plastes isolés de la même plante, l'épinard, sont incubés in vitro [Bassham et al., 1968] (cependant les plastes isolés sont incapables de synthétiser des sucres solubles). L'addition de substrats aux cellules incubées en milieu isotonique n'est pas suffisante pour retrouver les taux de fixation observés en milieu hypertonique : les valeurs sont inférieures de 50-60%, tableau 12. Il est probable que des composés nécessaires à l'activité photosynthétique diffusent hors des cellules et ne sont pas remplacés. Les cellules de gaines périvasculaires isolées (maïs, Panicum texanum), dont la perméabilité aux substrats photosynthétiques est très importante, doivent subir également des modifications irréversibles de composition lors de l'isolement et de l'incubation - de ce fait leur capacité à fixer le $CO_2$ est sûrement sous-estimée.

Photoassimilation du $CO_2$ par les cellules de gaines périvasculaires isolées d'Atriplex spongiosa.

Des gaines périvasculaires isolées de feuilles d'Atriplex spongiosa ont été préparées selon la méthode de Hatch et Kagawa [1973], par homogénéisation ménagée des feuilles (Waring-blendor) ; cette technique est très voisine de celle utilisée pour l'isolement des gaines de feuilles de maïs et Panicum (publication n° 3).

Les cellules de gaines isolées d'Atriplex montrent une capacité importante de fixation du $CO_2$ en l'absence de substrats exogènes (tableau 13), et une très faible stimulation de l'incorporation du $CO_2$ par addition de R5P. Corrélativement, on observe une perméabilité aux composés solubles synthétisés relativement réduite : 40-50%

| Milieu d'incubation | Vitesse de fixation du $CO_2$ | % du $^{14}C$ soluble à l'extérieur des cellules | Distribution du $^{14}C$ total fixé (en pourcentage) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | PGA et comp.voisins | sucres phosph. | sucres ac.amin. |
| Témoin | 38 | 40 | 33 | 17 | 49 |
| + R5P | 42 | 47 | 39 | 20 | 40 |

Tableau 13 Cellules de gaines isolées d'Atriplex spongiosa. Incubation dans un milieu B, d'osmolarité environ 400 milliosmoles/l. Consulter la légende du tableau 12 pour autres renseignements.

des composés solubles marqués sont exportés dans le milieu d'incubation, soit une valeur nettement plus faible que chez le maïs ou Panicum (tableau 4, publication n° 3). Le marquage des produits finaux du métabolisme (sucres, acides aminés) est important. Ainsi les cellules de gaines isolées d'Atriplex possèdent des propriétés très voisines des cellules isolées d'épinard incubées en milieu sensiblement isotonique (400 milliosmoles/l).